



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:**

**«Αναζήτηση των γονιδίων αντοχής OXA-48 σε  
καρβαπενέμη-ανθεκτικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae*»**

**ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΡΟΔΑΝΘΗ- ANNA του ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ**

**Πτυχιούχος Βιολογίας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης**

**Λάρισα,  
Οκτώβριος 2018**

### **Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:**

- Πετεινάκη Ευθυμία, (επιβλέπουσα) Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας και Κλινικής Μικροβιολογίας
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	4
Περίληψη .....	5
Abstract .....	5
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	6
<i>Klebsiella spp.</i> .....	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	8
Λοιμογόννοι παράγοντες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	10
Λοιμώξεις που προκαλούνται από <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	12
Αντοχή στα αντιβιοτικά .....	14
Β-λακταμικά αντιβιοτικά .....	16
Μηχανισμοί αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	18
Β-λακταμάσες .....	19
Καρβαπενεμάσες .....	20
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	24
1) Στελέχη βακτηρίων .....	24
2) Ταυτοποίηση στελεχών .....	24
3) Χρώση κατά Gram .....	24
4) Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek-2 .....	25
5) Απομόνωση DNA .....	26
6) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	27
7) Μοριακή Τυποποίηση με την μέθοδο Multi Locus Sequence Typing (MLST) .....	34
8) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR .....	36
9) Καθαρισμός των προϊόντων της PCR .....	38
10) Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων <i>BLAOXA-4848</i> και του MLST (Sequencing) .....	39
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	41
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	44
<b>ΕΠΙΛΟΓΟΣ</b> .....	47
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	48

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του διαγνωστικού τμήματος του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Η βασική εκπαίδευση, το πειραματικό μέρος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης έγιναν υπό την επίβλεψη της κυρίας Ευθυμίας Πετεινάκη, Καθηγήτριας Ιατρικής Βιοπαθολογίας και Κλινικής Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, την οποία και ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγησή της, τις υποδείξεις και διορθώσεις της σε όλες τις φάσεις διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά για την καθημερινή επίβλεψη, το χρόνο που μου αφιέρωσε και την αμέριστη συμπαράστασή της όλο αυτό το διάστημα . Χωρίς τη βοήθειά της η εκπόνηση αυτής της εργασίας δε θα ήταν δυνατή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ζωή Φλώρου και την Κατερίνα Τσιλιπουνιδάκη για την πολύ πολύτιμη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια παρουσίας μου στον εργαστηριακό χώρο, για την υπομονή και την επιμονή τους στην επεξήγηση των αποριών μου, την Εργίνα Μάλλη, την Ειρήνη Σεβδαλή, την Γερασιμίνα Τσίντη και την Φαίδρα Παρσοπούλου για την άριστη συνεργασία μας.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κύριο Θεόδωρο Αμπατζόπουλο, Καθηγητή Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης για την στήριξή του σε όλη την διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών σπουδών μου.

## Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τριάντα κλινικά στελέχη Gram αρνητικών βακτηριδίων που απομονώθηκαν από καλλιέργειες σωματικών υγρών από ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας από τον Ιούνιο του 2017 έως τον Αύγουστο του 2017.

Η αναζήτηση των γονιδίων αντοχής στις πενέμες νοσοκομειακών στελεχών Gram (-) αρνητικών βακτηριδίων έγινε με μοριακές μεθόδους (μοριακή ανίχνευση) και συγκεκριμένα με PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης). Σε 30 κλινικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae* αναζητήθηκε το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>*.

Με χρήση της PCR βρέθηκε ότι τα περισσότερα στελέχη των *Klebsiella pneumoniae* ήταν αρνητικά για το *bla<sub>OXA-48</sub>*, ενώ τρία ήταν θετικά για το συγκεκριμένο γονίδιο. Επιπλέον, διενεργήθηκε μοριακή τυποποίηση για τον χαρακτηρισμό των βακτηριακών κλώνων, με τη μέθοδο της πολυτοπικής τυποποίησης αλληλουχίας (MLST) και από τα αποτελέσματα της μελέτης παρατηρήσαμε ότι και τα 3 στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST101.

## Abstract

The current study included 30 isolates of Gram (-) negative bacteria that were isolated from various clinical units at the University Hospital of Larisa during the period of June 2017 to August 2017.

By the use of PCR (Polymerase Chain Reaction) and other molecular methods the search was about genes that give resistance in penems. In thirty clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* was researched the gene of *bla<sub>OXA-48</sub>*.

By the use of PCR it was found that the most of the isolates of *Klebsiella pneumoniae* were negative about *bla<sub>OXA-48</sub>* and only tree were positive for that gene. Furthermore, in order to characterize the bacterial clones, we conducted a molecular standardization with the method of the multilocus sequence typing (MLST) and the results showed that all3 isolates belong to clone ST101.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα Εντεροβακτηριακά (οικογένεια Enterobacteriaceae) είναι η μεγαλύτερη ομάδα από τα αρνητικά κατά Gram, βακτήρια (1). Είναι ραβδοειδή, ευθύγραμμα ή καμπυλοειδή, τα περισσότερα κινούνται με μαστίγια ενώ ορισμένα είναι ακίνητα και έχουν απλές θρεπτικές απαιτήσεις. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται στους 37 °C αν και πολλά είδη αναπτύσσονται καλύτερα στους 25-30 °C. Είναι ανθεκτικά στα χολικά άλατα (για αυτό επιζούν στο ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο) και αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα pH. Βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, στα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τα φυτά και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα των περισσότερων ζώων, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.

Τα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών αποτελούν τα πιο συχνά βακτηριακά είδη που απομονώνονται από τα κλινικά δείγματα. Ορισμένα μέλη της οικογένειας αυτής είναι πάντοτε παθογόνα για τον άνθρωπο, όπως τα είδη που ανήκουν στα γένη *Shigella spp.*, *Salmonellas pp.* και το είδος *Yersinia.pestis*, ενώ άλλα είδη όπως *Escherihia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας και είναι δυνατό να προκαλέσουν ευκαιριακές λοιμώξεις. Νοσηλευόμενα ή ανοσοκατεσταλμένα άτομα, ειδικά ασθενείς που λαμβάνουν αντιμικροβιακή θεραπεία, συχνά αποικίζονται από Gram-αρνητικά βακτήρια συμπεριλαμβανομένων και των Εντεροβακτηριακών.

Ένα από τα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών είναι η *Klebsiella spp* η οποία απαντάται συχνά στο νοσοκομειακό περιβάλλον, καθώς μπορεί να επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται εύκολα στο δέρμα των ασθενών και στις ξηρές επιφάνειες, λόγω των φτωχών θρεπτικών της απαιτήσεων (2). Το συγκεκριμένο είδος τελευταία προκαλεί ανησυχία, γιατί συχνά εκφράζει αντοχή σε πολλές τάξεις αντιμικροβιακών ουσιών με σοβαρές επιπτώσεις στη νοσηρότητα και την αύξηση της θνητότητας των ασθενών, με αποτέλεσμα να ενδημεί συχνά στις μονάδες και να προκαλεί επιδημίες.

### *Klebsiella spp.*

Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella spp.* παρουσιάζουν τα κύρια χαρακτηριστικά της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών. Πρόκειται για μη κινητά, ραβδωτά βακτήρια που έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσουν βλενώδεις αποικίες μια διαδικασία που προστατεύει τα βακτήρια από φαγοκυττάρωση και τα βοηθάει στην προσκόλληση (2).



Τα συχνότερα είδη που προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο είναι η *Klebsiella pneumoniae*, η *Klebsiella oxytoca* και η *Klebsiella ozaenae*. Τα περισσότερα στελέχη της *Klebsiella spp* διαθέτουν ένα παχύ έλυτρο (κάψα ή περίβλημα) από πολυσακχαρίτες, το οποίο τα κάνει ιδιαίτερα λοιμογόνα και ανθεκτικά στα αμυντικά κύτταρα (φαγοκύτταρα) του ανθρώπου.

Τα στελέχη της *Klebsiella spp* βρίσκονται στο έδαφος, τα φυτά και το νερό. Αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου και του βλεννογόνου του ανώτερου αναπνευστικού σε 10% των υγιών ανθρώπων. Επίσης βρίσκονται στη φυσιολογική χλωρίδα ορισμένων ζώων όπως για παράδειγμα σε άλογα και μοσχάρια(2). Τα είδη του γένους αυτού υπάρχουν σε παγκόσμιο επίπεδο, ιδιαίτερα σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές και είναι παρόντα μεταξύ άλλων σε δασικές περιοχές, έδαφος, νερό και στις βλεννογόνες μεμβράνες των ξενιστών. Παρότι είναι κοινά παθογόνα για εξωνοσοκομειακές πνευμονίες και βακτηριαιμίες, η πλειοψηφία των λοιμώξεων είναι νοσοκομειακές. Στο εξωτερικό περιβάλλον μπορεί να επιβιώσει για πολλές ημέρες. Καταστρέφονται σε υψηλή θερμοκρασία (100°C για 10 λεπτά) καθώς και από τα συνήθη απολυμαντικά (υδατικό διάλυμα οικιακής χλωρίνης 10%) και αντισηπτικά (οινόπνευμα 70%).

Τα στελέχη της *Klebsiella spp* μεταδίδονται συχνά αερογενώς από μολυσμένες εγκαταστάσεις κλιματισμού με υγραντικά μηχανήματα που χρησιμοποιούν μολυσμένο νερό. Συχνή είναι η ενδογενής μετάδοση από *Klebsiella spp* της φυσιολογικής χλωρίδας. Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η *Klebsiella pneumoniae* αν αναπτυχθεί στο έντερο μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και αξίζει να σημειωθεί ότι η *Klebsiella pneumoniae* έχει γίνει ανθεκτική στα αντιβιοτικά τα τελευταία χρόνια(3) . Η *Klebsiella ozaenae* βρίσκεται συχνά σε άτομα με χρόνια ατροφική ρινίτιδα με ιδιάζουσα δυσάρεστη μυρωδιά (όζαινα) και



πρόκειται για επιλοίμωξη ήδη υπάρχουσας ρινίτιδας (4). Επιπλέον τα στελέχη της *Klebsiella spp* αποτελούν μια από τις κυριότερες αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων μεταδίδονται με άμεση επαφή (χέρια νοσοκομειακού προσωπικού) προκαλώντας σοβαρές λοιμώξεις που θεραπεύονται δύσκολα καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών είναι πολυανθεκτικά. Σπανιότερα έχουν περιγραφεί περιστατικά μετάδοσης με φιάλες αίματος που είχαν μολυνθεί από τα χέρια του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού(1). Έχουν αναφερθεί επίσης και περιστατικά μετάδοσης *Klebsiella spp* με μολυσμένα τρόφιμα όπως για παράδειγμα σαλάτες(5).

Η *Klebsiella pneumoniae* και η *Klebsiella oxytoca* είναι συχνά αίτια λοιμώξεων του κατωτέρου αναπνευστικού συστήματος. Προκαλούν εξάρσεις χρόνιας βρογχίτιδας και σοβαρή έως και θανατηφόρο πνευμονία(5). Ως αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων προσβάλλουν άτομα ανοσοκατασταλμένα (ασθενείς σε μονάδες εντατικής θεραπείας, σε ογκολογικές κλινικές) και προκαλούν λοιμώξεις όπως ουρολοιμώξεις, λοιμώξεις μαλακών μορίων, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, περιτονίτιδα, λοιμώξεις τραυμάτων και χειρουργικές λοιμώξεις, οι οποίες εμφανίζουν αντοχή σε πολλά είδη αντιβιοτικών.

### *Klebsiella pneumoniae*

Η *Klebsiella pneumoniae* πήρε το όνομά της από τον Γερμανό βακτηριολόγο Edwin Klebs (1834-1913)(6). Πρόκειται για ένα ραβδόμορφο, μη κινητό Gram (-) μικροοργανισμό της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* και βρίσκεται στη φυσιολογική χλωρίδα του στόματος, του δέρματος και του εντέρου στον άνθρωπο.



Εικόνα 1 *Klebsiella pneumoniae*

Domain	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Gammoproteobacteria
Order	Enterobacteriales



Family	Enterobacteriaceae
Genus	<i>Klebsiella</i>
Species	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Πίνακας 1: Κατάταξη της *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter 1886- Trevisan 1887)

Έχει μέγεθος περίπου 2μm (x) 0.5μm και δεν σχηματίζει σπόρια. Αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά. Υλικό εκλογής για εύκολη αναγνώρισή της είναι το άγαρ MacConkey. Οι αποικίες της πάνω σε αυτό είναι μεγάλες και κόκκινες, από τη διάσπαση της λακτόζης, υδαρείς, πολύ «γλυστερές» και βλενώδεις. Υπάρχουν όμως και αποικίες μη βλενώδεις που δεν ξεχωρίζουν από τις αποικίες των *E.coli*(7).



Εικόνα 2 Καλλιέργεια της *Kl.pneumoniae* σε MacConkey



Εικόνα 3 Διαφορά καλλιέργειας *E.coli* και *Kl.pneumoniae* σε MacConkey άγαρ

Η *Klebsiella* είναι από τα πιο ενεργά Εντεροβακτηριακά. Ζυμώνει τη γλυκόζη, τη λακτόζη και πολλά σάκχαρα, όχι μόνο με παραγωγή οξέος αλλά και αερίου. Αλλά οι πιο χαρακτηριστικές βιοχημικές της ιδιότητες είναι:

- Ινδόλη (-)
- M.R. (-)
- V.P. (-)
- Κιτρικά (+)
- Ουρία (+)
- H<sub>2</sub>S (-)
- Λυσίνη (+)
- Ορνιθίνη (-)
- Κινητικότητα (-)
- Αέριο από γλυκόζη (+)

- Φαινυλαλανίνη (PPA) (-)

Από τις σακχαροδιασπαστικές της ιδιότητες η πιο χαρακτηριστική είναι η παραγωγή αερίου από το άμυλο, ιδιότητα που την ξεχωρίζει από τα Εντεροβακτηριακά. Ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξης είναι η των 47°C και οι ακραίες αναπτύξεώς της 12 °C μέχρι 43 °C. Πεθαίνει στους 55°C για 30 λεπτά. Επιζεί στην ξήρανση για μήνες.

Το γονιδιώμά της είναι περίπου 5Mbp σε κυκλικό χρωμόσωμα. Πολλές γενετικές μεταβολές συμβαίνουν στα καλλιεργήματα της *Klebsiella pneumoniae* (in vitro) αλλά και στη μικροβιακή χλωρίδα του ανθρώπινου σώματος (in vivo). Οι πιο συχνές είναι αυτές που συμβαίνουν στα στελέχη της *Klebsiella pneumoniae* των ασθενών στα νοσοκομεία. Έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν πλασμίδια που έχουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά (R) με αποτέλεσμα την δημιουργία πολυανθεκτικών στελεχών. Εκτός των γονιδίων αντοχής, με τις συζεύξεις μεταφέρονται και άλλες ιδιότητες όπως για παράδειγμα η ιδιότητα παραγωγής βακτηριοσινών. Ένα επιπλέον παράδειγμα αποτελεί η μεταφορά του παράγοντα Lac (ζυμώσεως λακτόζης) από την *E.coli* K-12 in vitro. Ακόμη έχουν επιτευχθεί χρωμοσωμικοί ανασυνδυασμοί όπως αναφέρεται από Ιάπωνες μικροβιολόγους(8).

### Λοιμογόνοι παράγοντες της *Klebsiella pneumoniae*

Όσον αφορά το σχήμα της, έχει πυκνό πολυσακχαριδικό έλυτρο (160nm), το αντιγόνο K, το οποίο μαζί με τον πολυσακχαρίτη (αντιγόνο O) συμβάλλει στην παθογονικότητά της. Πιο συγκεκριμένα οι κυριότεροι παράγοντες λοιμογόνου δύναμης του βακτηρίου είναι:

- Προσκολλητίνες

Μεταξύ των διαφόρων τύπων ινιδίων που απαντώνται στα Εντεροβακτηριακά στην *Klebsiella spp* επικρατούν δύο τύποι, οι οποίοι βρίσκονται στην πλειοψηφία των κλινικών και επιδημιολογικών στελεχών. Αυτά είναι τα Ινίδια τύπου 1 των οποίων ο ρόλος στην παθογονικότητα των βακτηρίων προκύπτει από την ικανότητα τους να συνδέονται με τον βλεννογόνο του ουροποιογεννητικού και αναπνευστικού συστήματος και του εντέρου μέσω της προσκολλητίνης FimH και τα Ινίδια τύπου 3 όπου στελέχη με τα συγκεκριμένα ινίδια προσκολλώνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε επιθήλια του ουροποιητικού και αναπνευστικού συστήματος. Στους νεφρούς συμβάλλουν στην προσκόλληση των βακτηρίων στην κάψα του Bowman, στη βασική μεμβράνη των νεφρικών σωληνάρων και στα ενδοθήλια των αγγείων.

- Πολυσακχαρίτης ελύτρου

Τα είδη της *Klebsiella* περιβάλλονται από πυκνή στιβάδα όξινων πολυσακχαριτών, που συνιστούν το έλυτρο του μικροβίου, το οποίο είναι γνωστό και ως αντιγόνο K. Το έλυτρο προστατεύει το μικρόβιο από την φαγοκυττάρωση και το βακτηριοκτόνο σύστημα του ορού, συμβάλλοντας έτσι στην παθογονικότητα του, η οποία όμως διαφοροποιείται ανάλογα με τους διάφορους τύπους ελύτρου. Το έλυτρο, επίσης, περιέχει μόρια που διαμεσολαβούν στη δέσμευση του μικροβίου με τα κύτταρα του ξενιστή. Ο βαθμός παθογονικότητας φαίνεται να σχετίζεται με την ποσότητα των πολυσακχαριτών του ελύτρου σε μαννόζη. Ιδιαίτερα λοιμογόνα θεωρούνται τα στελέχη που εκφράζουν τα K1 και K2 αντιγόνα ελύτρου. Ο ορότυπος K2 επικρατεί σε ασθενείς με ουρολοίμωξη, πνευμονία και βακτηραιμία και εν γένει μεταξύ των κλινικών στελεχών, ενώ σχεδόν απουσιάζει από τα στελέχη του περιβάλλοντος. Οι ορότυποι K2 και K25 έχουν βρεθεί συχνότερα μεταξύ των στελεχών που παράγουν ESBL, ενώ στελέχη με ESBL μπορεί να έχουν μεγαλύτερη λοιμογόνο δύναμη λόγω της ικανότητας τους να διαφεύγουν της φαγοκυτταρικής δράσης των πολυμορφοπυρήνων(6).

- Λιποπολυσακχαρίτης κυτταρικού τοιχώματος (LPS)

Το βακτηριοκτόνο σύστημα του ορού αποτελεί μαζί με την φαγοκυττάρωση την πρώτη γραμμή άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού έναντι των μικροβίων και επιτυγχάνεται μέσω των πρωτεϊνών του συμπληρώματος. Γενικά τα παθογόνα στελέχη είναι ανθεκτικά στη βακτηριοκτόνο δράση του ορού και αυτό σχετίζεται με διάφορους παράγοντες, όπως είναι ο πολυσακχαρίτης του ελύτρου, ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και πρωτεΐνες επιφάνειας. Μεταξύ των εννέα οροτύπων που υπάρχουν στην *Kl. pneumoniae*, ο ορότυπος 01 φαίνεται ότι εκφράζει τη μεγαλύτερη αντοχή στη βακτηριοκτόνο δράση και απαντάται συχνότερα στα κλινικά στελέχη (9). Η σύνθεση του LPS ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως παράδειγμα είναι η οσμωτικότητα. Έτσι το ίδιο στέλεχος μπορεί να είναι ανθεκτικό στη βακτηριοκτόνο δράση του ορού όταν βρίσκεται σε θέση του σώματος με υψηλή οσμωτικότητα, όπως είναι τα ούρα, και το αντίθετο όταν είναι σε χαμηλή οσμωτικότητα, όπως είναι το αναπνευστικό σύστημα.

- Σιδηροφόρα συστήματα

Στην *Klebsiella spp* έχουν βρεθεί και δύο σιδηροφόρα συστήματα: το σύστημα της αεροβακτίνης και το σύστημα της εντεροβακτίνης. Το πρώτο υπάρχει σε όλα σχεδόν τα στελέχη, ενώ δεν φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην παθογονικότητα αφού στελέχη εντεροβακτίνη-θετικά δεν είναι περισσότερο λοιμογόνα από στελέχη εντεροβακτίνη-αρνητικά. Αντίθετα το

σύστημα της αεροβακτικής απαντάται σπάνια, αλλά παίζει πρωτεύοντα ρόλο στη λοιμογόνο δύναμη του μικροβίου.

Τα κύρια αντιγόνα της *Klebsiella pneumoniae* είναι το K- αντιγόνο ελύτρου και το O-σωματικό αντιγόνο. Βάσει των δύο αυτών αντιγόνων τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* χωρίζονται σε K- τύπους και σε O- τύπους, καθώς υπάρχουν και συνδυασμοί αυτών των δύο τύπων. Υπάρχουν 80 K- τύποι και 11 O- τύποι. Τέσσερις από τους O- τύπους έχουν αντιγονική ομοιότητα με τα O- αντιγόνα των στελεχών *E. coli*. Γι αυτούς τους δύο λόγους για την οροτυπία των *Klebsiella pneumoniae* χρησιμοποιούνται τα K- αντιγόνα. Ένας επιπλέον λόγος είναι το ότι είναι δυσκολότερο να παρασκευασθούν αντί- O οροί από τους αντί- K. Λόγω της θερμοανθεκτικότητας των K- αντιγόνων είναι δύσκολο να παρθεί καθαρό O- αντιγόνο για την παρασκευή των O- ορών. Η τεχνική της οροτυπίας είναι η κλασσική της εξοιδήσεως του ελύτρου και μικροσκόπηση με σινική μελάνη(8).

### Λοιμώξεις που προκαλούνται από *Klebsiella pneumoniae*

Η *Kl. pneumoniae* βρίσκεται στον γαστρεντερικό σωλήνα των θηλαστικών ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας (μικροβίωμα). Άτομα με χαμηλή άμυνα στο αναπνευστικό τους σύστημα είναι αρκετά ευαίσθητα σε λοίμωξη των πνευμόνων από *Klebsiella pneumoniae*. Η λοίμωξη αυτή οδηγεί σε φλεγμονή, νέκρωση και αιμορραγία των πνευμόνων. Στο μικρόβιο της *Klebsiella pneumoniae* οφείλονται αρκετές νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως η πνευμονία, η βακτηραιμία, η μηνιγγίτιδα, διάρροια και λοιμώξεις μαλακών ιστών. Λοιμώξεις από το συγκεκριμένο βακτήριο είναι πιο κοινές σε πολύ νέους, πολύ ηλικιωμένους και σε ασθενείς με άλλες σοβαρές νόσους, όπως ο καρκίνος. Για να πραγματοποιηθεί λοίμωξη από *Kl. pneumoniae*, το άτομο πρέπει να εκτεθεί σε βακτηρίδια. Με άλλα λόγια, η *Kl. pneumoniae* πρέπει να εισέλθει στην αναπνευστική οδό για να προκαλέσει πνευμονία. Σε περιβάλλοντα υγειονομικής περίθαλψης, τα βακτήρια της *Kl. pneumoniae* μπορούν να εξαπλωθούν μέσω προσωπικής επαφής (για παράδειγμα, μολυσμένα χέρια του προσωπικού υγείας ή άλλων ατόμων καθώς και από ασθενή σε ασθενή) ή, λιγότερο συχνά, από μόλυνση του περιβάλλοντος. Οι ασθενείς σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης μπορούν επίσης να εκτεθούν στην *Kl. pneumoniae* από ενδοφλέβιους καθετήρες ή τραύματα. Τέλος, τόσο τα ιατρικά εργαλεία όσο και οι συνθήκες μπορεί να επιτρέψουν στην *K. pneumoniae* να εισέλθει στο σώμα και να προκαλέσει μόλυνση. Τα στελέχη *K. pneumoniae* είναι συχνά ανθεκτικά σε πολλαπλά αντιβιοτικά. Τα σημερινά στοιχεία ενέχουν τα πλασμίδια ως την κύρια πηγή των γονιδίων ανθεκτικότητας(10).

- **Πνευμονία**

Από τις διάφορες πνευμονίες διαφορετικής αιτιολογίας, αυτές που οφείλονται στην *Klebsiella pneumoniae* αποτελούν το 0,5-5%. Συνήθως είναι δευτεροπαθείς αλλά υπάρχουν και πρωτοπαθείς. Προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η κάθε μείωση της φυσικής άμυνας, η ύπαρξη νόσων του αναπνευστικού ή βλαβών του πνευμονικού ιστού, ο διαβήτης, ο αλκοολισμός καθώς και άλλα. Προκαλείται από τους K- τύπους 1,2 και 3(11).

Η κλινική εικόνα είναι παρόμοια με αυτή της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας, αλλά η *Klebsiella pneumoniae* φαίνεται να είναι πιο διαβρωτικό μικρόβιο το οποίο προκαλεί τήξη ιστών και δημιουργία πνευμονικών αποστημάτων(6). Η νόσος είναι βαρεία με υψηλή θνησιμότητα, αν παραμείνει χωρίς θεραπεία (50 – 90%). Συνοδεύεται συχνά με μικροβαιμία. Η θεραπεία γίνεται με κεφαλοσπορίνη σε συνδυασμό με γενταμικίνη ή άλλη αμινογλυκοσίδη, ενώ παρουσιάζει αντοχή στην πενικιλίνη. Οξεία βρογχοπνευμονία είναι μια άλλη αναπνευστική νόσος που προκαλείται από την *Klebsiella pneumoniae*.

- **Ουρολοίμωξη**

Η *Klebsiella pneumoniae* είναι το δεύτερο κατά σειρά, μετά την *E.coli*, αίτιο ουρολοιμώξεων. Είναι συχνότερη στις υποτροπές και στις ουρολοιμώξεις που δεν υποβλήθηκαν σε σωστή θεραπεία. Η λοίμωξη είναι σχεδόν πάντα, εκτός της νεογνικής, ανιούσα. Είναι συχνότερη και από την *E.coli* στις ουρολοιμώξεις από αποφρακτική ουροπάθεια π.χ. σε ασθενείς που έχουν άλλη νόσο του ουροποιητικού που προκαλεί απόφραξη στο ουροποιητικό. Επίσης είναι συχνή σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε κυστεοσκόπηση ή σε καθετηριασμό. Στις δευτεροπαθείς ουρολοιμώξεις, συνυπάρχει συνήθως με *Proteus spp* ή με *E.coli* ή με εντερόκοκκο(12).

- **Μηνιγγίτιδα και σηψαιμία νεογνική**

Στους νεογνικούς θαλάμους των παιδιατρικών νοσοκομείων η μηνιγγίτιδα και η σηψαιμία από *Klebsiella pneumoniae* εμφανίζονται υπό μορφή ενδονοσοκομειακών μολύνσεων επιδημικών και ενδημικών. Είναι βαρέα νοσήματα με υψηλή θνητότητα. Το στέλεχος το επιδημικό είναι συνήθως πολυανθεκτικό σε αντιβιοτικά. Επιπροσθέτως, η *Klebsiella pneumoniae* βρέθηκε σαν κύριο αίτιο σε ποικίλες σηπτικές λοιμώξεις σε άτομα μειωμένης ανοσολογικής άμυνας(11).

- **Ενδοτοξικό σοκ**

Παρατηρείται σε ασθενείς με σηψαιμία και σε ασθενείς που λαμβάνουν ενδοφλεβια υγρά μολυσμένα με *Klebsiella pneumoniae*. Χαρακτηριστική είναι η «δραματική» περίπτωση

θανάτου μερικών παιδιών που δέχθηκαν μετάγγιση αίματος από φιάλες στις οποίες το αντιπηκτικό διάλυμα είχε μολυνθεί από *Klebsiella pneumoniae*(11).

### Αντοχή στα αντιβιοτικά

Συνήθως με τον όρο αντιβιοτικά εννοούμε ουσίες οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς και δρουν έναντι άλλων μικροοργανισμών (αντι-βιοτικά). Σήμερα όμως, ο όρος αντιβιοτικό τείνει να αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο αντιμικροβιακό φάρμακο, ο οποίος εκτός από τα φυσικά παράγωγα, περιλαμβάνει ακόμη και τα ημι-συνθετικά (π.χ. ημι-συνθετικές πενικιλίνες) και τα χημειοθεραπευτικά ή συνθετικά αντιβιοτικά (λινεξολίδη, κινολόνες). Τα αντιβιοτικά δρουν σε διάφορα κύρια σημεία του μικροβιακού κυττάρου, δηλαδή στο κυτταρικό τοίχωμα, στο γενετικό υλικό, στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και στα ριβοσώματα(13).

Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους τα αντιβιοτικά χωρίζονται είτε σε βακτηριοκτόνα, τα οποία προκαλούν λύση και κατ' επέκταση θάνατο του μικροβιακού κυττάρου είτε βακτηριοστατικά τα οποία αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατόν ένα αντιβιοτικό άλλοτε να δρα ως βακτηριοκτόνο και άλλοτε ως βακτηριοστατικό. Ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι απόλυτος, καθώς η βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνος δράση ενός αντιβιοτικού εξαρτάται από την συγκέντρωσή του.

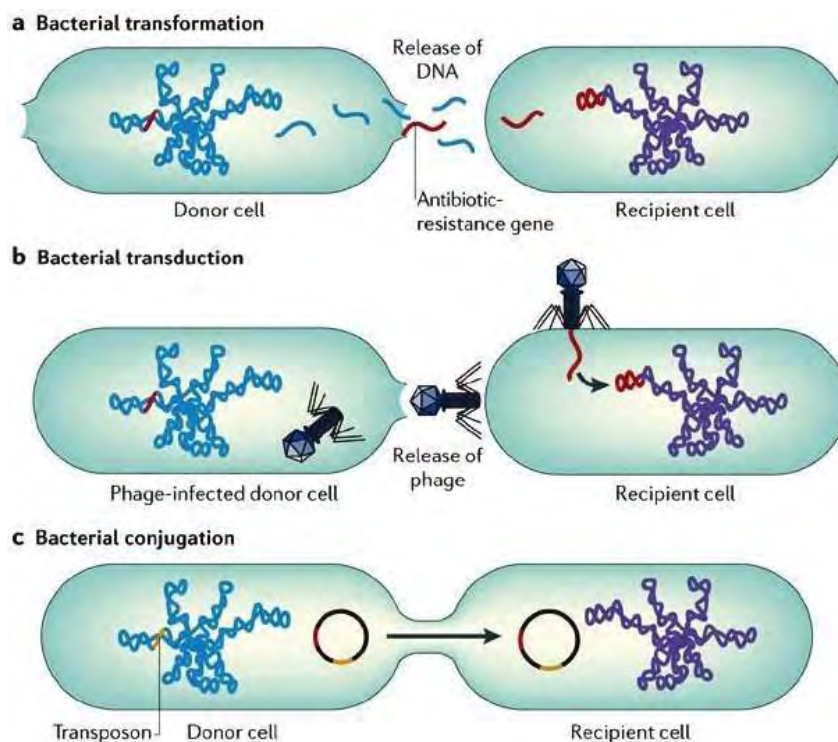
Οι μικροοργανισμοί, μέσα από την πίεση της αντιμικροβιακής θεραπείας αναπτύσσουν αρχικά απλούστερους και στη συνέχεια πολυπλοκότερους μηχανισμούς αντοχής. Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντοχής των μικροοργανισμών απέναντι στα αντιμικροβιακά φάρμακα είναι: 1) η ενζυμική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού μέσω παραγωγής ενζύμων, 2) ο μηχανισμός αντλίας, όπου το μικροβιακό κύτταρο με κατανάλωση ενέργειας μεταφέρει το αντιβιοτικό έξω από το κύτταρο, 3)η τροποποίηση του στόχου δράσης, όπου ο μικροοργανισμός μέσω γενετικών αλλαγών τροποποιεί το στόχο σύνδεσης του αντιβιοτικού πάνω στον μικροβιακό στόχο και έτσι το αντιβιοτικό δεν μπορεί να δράσει(15).

Η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής εξαρτάται από το συγκεκριμένο φάρμακο και το συγκεκριμένο βακτήριο καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις μια απλή μετάλλαξη στο βακτηριακό γονιδίωμα είναι ικανή να προκαλέσει κλινικά σημαντική αντοχή, ενώ σε άλλες περιπτώσεις χρειάζονται πολλαπλές μεταλλάξεις για εμφάνιση φαινοτυπικής αντοχής. Η *Kl. pneumoniae* επιδεικνύει μία αξιοσημείωτη ικανότητα ταχείας ανάπτυξης αντοχής έναντι των



αντιμικροβιακών παραγόντων, γεγονός που αποτελεί αντικείμενο μελέτης και προβληματισμού για την ιατρική κοινότητα.

Οι μηχανισμοί μεταφοράς γενετικού υλικού περιλαμβάνουν την βακτηριακή σύζευξη, τη μεταγωγή και τον μετασχηματισμό των βακτηρίων.



Εικόνα 4 Μηχανισμοί μεταφοράς γενετικού υλικού στα βακτήρια

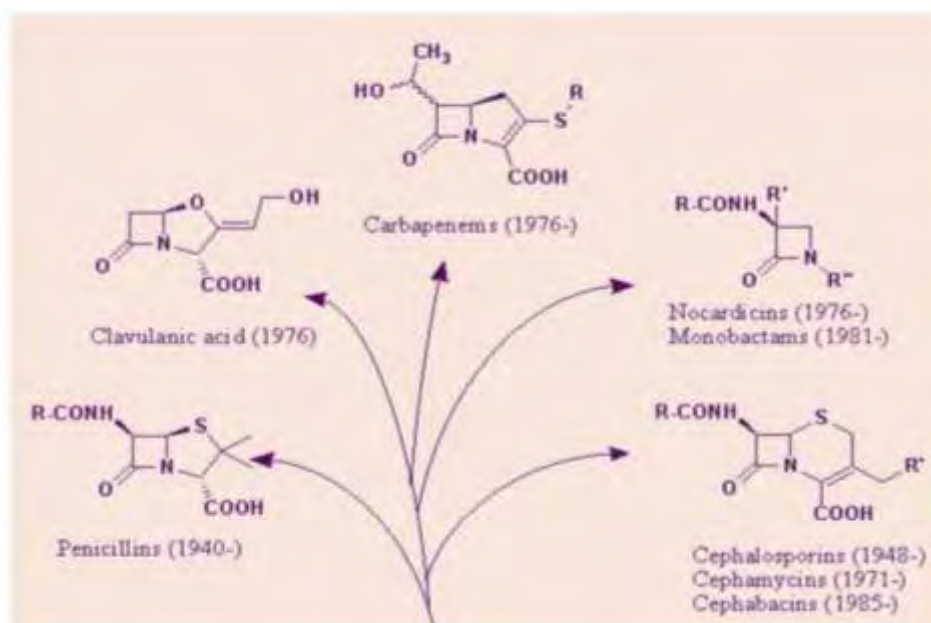
Η μεταμόρφωση αφορά στην ικανότητα του βακτηρίου να προσλαμβάνει και να ενσωματώνει γυμνό DNA, το οποίο απελευθερώνεται στο περιβάλλον μετά από autolysis βακτηρίων. Η μεταγωγή ορίζεται ως η μεταφορά τμήματος DNA ενός βακτηρίου σε ένα άλλο βακτήριο μέσω φάγου. Η μεταγωγή αποτελεί σημαντικό μηχανισμό εμπλουτισμού βακτηρίων με γονίδια παθογονικότητας. Όσον αφορά τη μετακίνηση γονιδίων αντοχής φαίνεται ότι η μεταγωγή είναι μάλλον ασυνήθιστος τρόπος. Η σύζευξη αποτελεί το συχνότερο μηχανισμό οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού και είναι ο κυριότερος μηχανισμός δημιουργίας ανθεκτικών Gram (-) βακτηρίων. Κατά τη διαδικασία αυτή μέσω της φυσικής επαφής δύο μικροβιακών κυττάρων και παραγωγής συζευκτικού ινιδίου μεταβιβάζει το ένα κύτταρο στο άλλο αντίγραφο του πλασμιδίου του. Η σύζευξη είναι ιδιότητα του πλασμιδίου και όχι του βακτηριακού κυττάρου. Ανάλογα με την ικανότητα τους να μεταφέρουν αντίγραφα τους σε άλλα βακτήρια, τα πλασμίδια διακρίνονται σε συζευκτικά ή μη. Επιπρόσθετα τα συζευκτικά πλασμίδια έχουν την ικανότητα να κινητοποιούν μη συζευκτικά πλασμίδια.



## B-λακταμικά αντιβιοτικά

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά χαρακτηρίζονται από την υψηλή ειδικότητα και αποτελεσματικότητά τους και γι' αυτό εξακολουθούν να αποτελούν τους σημαντικότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες σήμερα. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για την προφύλαξη αλλά και τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κατά των Gram- θετικών (+) βακτηρίων. Ωστόσο η ραγδαία ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος β-λακταμικών αντιβιοτικών επέκτεινε τη δράση τους και κατά διάφορων Gram- αρνητικών (-) μικροοργανισμών(10). Η συγκεκριμένη ομάδα αντιβιοτικών αναστέλλει την βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων, συνδεόμενα με ειδικούς υποδοχείς, τις πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), που εδράζονται στο κυτταρικό τοίχωμα. Τα αντιβιοτικά αυτά αποτελούν την πιο διαδεδομένη ομάδα αντιβιοτικών(10).

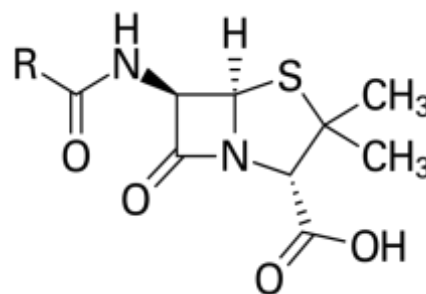
Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά περιλαμβάνουν ουσίες που στο μόριό τους περιέχουν τον πυρήνα της β-λακτάμης. Τα μέλη της ομάδας αυτής είναι: 1. Οι πενικιλλίνες, το μόριο των οποίων εκτός από τον τετραμελές δακτύλιο της β-λακτάμης, περιλαμβάνει και τον πενταμελή δακτύλιο της θειαζολιδίνης. 2. Οι κεφαλοσπορίνες, με τον β-λακταμικό και τον εξαμελή δακτύλιο της διυδροθειαζίνης, 3. Οι μονοβακτάμες, που στον βασικό τους πυρήνα έχουν μόνο τον δακτύλιο της β-λακτάμης, 4. Οι καρβαπενέμες και 5. Οι αναστολείς των β-λακταμασών.



Εικόνα 5 Χημικές δομές των β-λακταμικών αντιβιοτικών

## 1) Πενικιλίνες

Στην ομάδα των πενικιλινών ανήκουν οι φυσικές και οι ημισυνθετικές πενικιλίνες. Ο β- λακταμικός δακτύλιος είναι ενωμένος με ένα πενταμελή θειαζολινικό δακτύλιο. Τα διάφορα μέλη της ομάδας των πενικιλινών διαφέρουν ως προς τις πλευρικές αλυσίδες του μορίου, οι οποίες τροποποιούν τις αντιβακτηριακές ιδιότητες της κάθε πενικιλίνης. Οι φυσικές πενικιλίνες παράγονται από



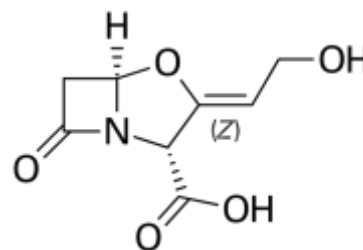
Εικόνα 6 Σκελετική δομή πενικιλίνης

μύκητες του γένους *Penicillium*. Το αντιμικροβιακό

φάσμα των φυσικών πενικιλινών περιλαμβάνει κυρίως Gram θετικά βακτήρια και μερικά Gram αρνητικά βακτήρια. Δεν είναι δραστικές ενάντι των εντεροβακτηριακών. Οι ημισυνθετικές πενικιλίνες είναι δραστικές έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων(16).

## 2) Αναστολείς β-λακταμασών

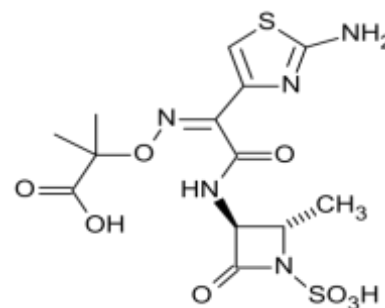
Οι αναστολείς των β-λακταμασών είναι β- λακταμικά μόρια με ασθενή αντιβακτηριακή δράση, αλλά με σημαντική δυνατότητα αναστολής των β- λακταμασών. Το κλαβουλανικό οξύ υπήρξε ο πρώτος αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη. Έκτοτε έχουν αναπτυχθεί και άλλοι αναστολείς β-λακταμασών, μεταξύ των οποίων οι σουλφόνες του πενικιλλανικού οξέος (σουλβακτάμη και ταζοβακτάμη)(17).



Εικόνα 7 Δομή του κλαβουλανικού οξέος

## 3) Μονοβακτάμες

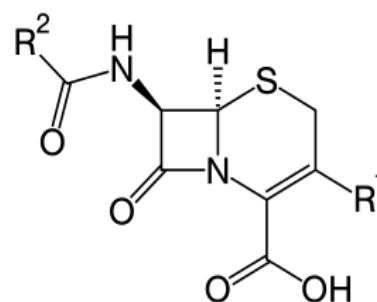
Στις μονοβακτάμες, ο β-λακταμικός δακτύλιος, σε αντίθεση με τα περισσότερα β- λακταμικά αντιβιοτικά, έχει μόνο έναν υποκαταστάτη. Η μόνη μονοβακτάμη που κυκλοφορεί στο εμπόριο είναι η συνθετική αζτρεονάμη, η οποία είναι δραστική έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων. Ωστόσο, η αζτρεονάμη δεν έχει δράση έναντι των Gram θετικών και των αναερόβιων βακτηρίων. Είναι γενικά σταθερή στη παρουσία των β-λακταμασών εκτός των πλασμιδιακών ενζύμων με εκτεταμένο φάσμα(18).



Εικόνα 8 Δομή της αζτρεονάμης

#### 4) Κεφαλοσπορίνες

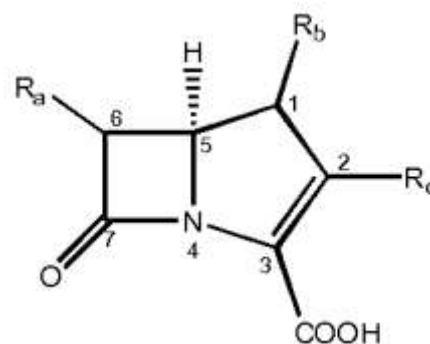
Οι κεφαλοσπορίνες είναι βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά με ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα που περιλαμβάνει Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Η πρώτη κεφαλοσπορίνη απομονώθηκε από τον μύκητα *Cephalosporium*. Η δομή του μορίου των κεφαλοσπορινών χαρακτηρίζεται από έναν εξαμελή διϋδροθειαζολινικό δακτύλιο, ο οποίος συνδέεται με τον β-λακταμικό δακτύλιο. Ο εξαμελής αυτός δακτύλιος επιτρέπει τη γρηγορότερη είσοδο των κεφαλοσπορινών στο κύτταρο των Gram αρνητικών βακτηρίων. Οι κεφαλοσπορίνες διακρίνονται σε τέσσερις γενιές σύμφωνα με το αντιμικροβιακό τους φάσμα και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες(19).



Εικόνα 9 Δομή των κεφαλοσπορινών

#### 5) Καρβαπενέμες

Πρόκειται για μία κατηγορία β- λακταμικών αντιβιοτικών με ευρύ φάσμα αντιβακτηριδιακής δράσης. Οι καρβαπενέμες έχουν δομή που τις καθιστά εξαιρετικά ανθεκτικές στις περισσότερες β- λακταμάσες. Αναπτύχθηκαν από τη θειαναμυκίνη (thienamycin), που προέρχεται από τον *Streptomyces Cattleya*. Η συγκεκριμένη κατηγορία αντιβιοτικών αφορά αντιβιοτικά τελευταίας άμυνας για πολλές βακτηριακές λοιμώξεις, όπως στην *Escherichia coli* και στην *Klebsiella pneumoniae*. Παρόλα αυτά, ο κίνδυνος για ανάπτυξη αντοχής από τα βακτήρια αυτά στις καρβαπενέμες έγινε πραγματικότητα και αυτό λόγω της παραγωγής ενζύμων(20).



Εικόνα 10 Σκελετική δομή καρβαπενέμης

#### Μηχανισμοί αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Οι μηχανισμοί αντοχής στις β-λακτάμες περιλαμβάνουν την τροποποίηση των πενικιλλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs), την παραγωγή β-λακταμασών, την μειωμένη διαπερατότητα – απώλεια πορινών και συστήματα αντλιών ενεργητικής αποβολής του αντιβιοτικού.

Η δομή των β- λακταμικών αντιβιοτικών προσομοιάζει με το αμινοξύ D-alanyl-D-alanine. Η δομική ομοιότητα αυτή μεταξύ των αντιβιοτικών β- λακτάμης και της D-alanyl-D-alanine διευκολύνει κατά πολύ τη σύνδεσή τους με την ενεργή θέση των PBPs. Συγκεκριμένα, ο πυρήνας της β –λακτάμης συνδέεται μη αναστρέψιμα (acylation) με το Ser<sub>403</sub> της ενεργής θέσης των PBPs. Αυτή η μη αναστρέψιμη αναστολή των PBPs έχει ως αποτέλεσμα να εμποδίζει τη σύνδεση της μιας πολυμερικής αλυσίδας με την άλλη (transpeptidation) στο υπό ανάπτυξη στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, διαταράσσοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος(21).

Υπό κανονικές συνθήκες, οι πρόδρομες ουσίες της πεπτιδογλυκάνης σηματοδοτούν μια αναδιοργάνωση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και κατά συνέπεια ενεργοποιούν τις αυτολυτικές υδρολάσες του κυτταρικού τοιχώματος. Η αναστολή σύνδεσης των αλυσίδων μεταξύ τους από τις β- λακτάμες προκαλεί συσσώρευση πρόδρομων ουσιών πεπτιδογλυκάνης από αυτολυτικές υδρολάσες χωρίς την παραγωγή καινούργιων στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι ότι η βακτηριογόνος δράση των β- λακταμικών αντιβιοτικών ενισχύεται περαιτέρω.

Η β-λακταμάση είναι ένα εξωκυττάριο ένζυμο που συντίθεται όταν ο μικροοργανισμός εκτίθεται σε β-λακταμικά αντιβιοτικά και δρα υδρολύοντας τον β-λακταμικό δακτύλιο, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του β-λακταμικού αντιβιοτικού.

### B-λακταμάσες

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για την παραγωγή των β-λακταμασών βρίσκονται είτε στο χρωμόσωμα είτε σε πλασμίδια(21). Τα χρωμοσωμικά ένζυμα, τα οποία προϋπήρχαν των αντιβιοτικών, βρίσκονται σε στελέχη όλων των ειδών, εκκρίνονται ιδιοστατικά και η ανάπτυξη τους συνέβη για την προστασία των βακτηρίων από τα φυσικά β- λακταμικά παράγωγα μυκήτων και βακτηρίων. Όσον αφορά τις πλασμιδιακές β- λακταμάσες, φυλογενετικά προέρχονται από τις χρωμοσωμικές.

Η μοριακή ταξινόμηση των β- λακταμασών βασίζεται στην ακολουθία νουκλεοτιδίων και αμινοξέων στα ένζυμα αυτά. Έχουν αναγνωριστεί τέσσερις τάξεις κατά Amplicon (A-D) οι οποίες σχετίζονται με τη λειτουργική τους ταξινόμηση. Οι A, C και D έχουν βάση τη σερίνη για τη δράση τους, ενώ η B (μέταλλο-β- λακταμάσες) τον ψευδάργυρο(22). Χαρακτηριστικό των β-λακταμασών είναι ότι έχουν σχετική ειδικότητα υποστρώματος, δηλαδή το κάθε ένζυμο υδρολύει συνήθως μόνο ένα αντιβιοτικό (ή μια μικρή ομάδα αντιβιοτικών). Ο μηχανισμός δράσης τους συνίσταται στην υδρόλυση του β- λακταμικού δακτυλίου και επιτυγχάνεται με τη δράση εστέρα σερίνης (ένζυμα ομάδας σερίνης, serine b- lactamases) ή με τη δράση ιόντων ψευδαργύρου (zinc b- lactamases).

Η πιο διαδεδομένη ταξινόμηση των β- λακταμασών τις διαχωρίζει σε τέσσερις ομάδες:

- **Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες, ESBL**

Ο όρος «Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες» (Extended Spectrum BLactamases, ESBL) αναφέρεται σε ένζυμα που υδρολύουν τις πενικιλίνες, τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και την αζιτρεονάμη και βρίσκονται κυρίως σε Εντεροβακτηριακά. Στις ευρέως φάσματος

περιλαμβάνονται οι TEM-1 και TEM-2, SHV-1 και κάποιες της ομάδας των OXA. Υπόστρωμα για τα συγκεκριμένα ένζυμα είναι η πενικιλίνη G, οι αμινο- και καρβόξυ- πενικιλίνες καθώς και οι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς. Τα ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα των OXA υδρολύουν και τη μεθικιλίνη και την οξασιλλίνη. Οι ευρέως φάσματος β- λακταμάσες αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και ανήκουν στην τάξη A κατά Amplic, εκτός των OXA που ανήκουν στην D. Επίσης περιλαμβάνονται ένζυμα των ομάδων TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, PER, GES, IBC, SFO, TLA, VEB. Η σημασία της ονομασίας καθεμιάς από αυτές τις ομάδες έγκειται σε ορισμένα κοινά τους χαρακτηριστικά, όπως τη χημική τους ομοιότητα ή την ικανότητά τους να αναστέλλουν συγκεκριμένα αντιμικροβιακά φάρμακα πιο εύκολα.

- **AmpC β-λακταμάσες (κεφαλοσπορινάσες)**

Τα περισσότερα αρνητικά κατά Gram βακτήρια φέρουν χρωμοσωμικές AmpC β-λακταμάσες, ενώ πλασμιδιακές έχουν τυποποιηθεί κυρίως σε στελέχη που στερούνται του χρωμοσωμικού επαγωγίμου γόνου, όπως είναι η *Kl. Pneumoniae* (22). Τόσο οι χρωμοσωμικές, όσο και οι πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες προσφέρουν ευρύτερο φάσμα αντοχής από τις ESBL. Οι AmpC β-λακταμάσες δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών (πχ κλαβουλανικό οξύ) και δεν υδρολύουν τις καρβαπενέμες. Οι AmpC περιλαμβάνουν ένζυμα των ομάδων ACC, CFE, CMY, FOX, LAT, MOX.

- **Καρβαπενεμάσες**

Οι καρβαπενεμάσες ανήκουν στις μοριακές κλάσεις A, B και D β-λακταμασών, που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν καρβαπενέμες. Περιλαμβάνουν ένζυμα των ομάδων VIM, IMP, KPC, CMY, MME, IMI, NMC, CcrA, NDM-1 και ορισμένα της ομάδας OXA (αναλύονται λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα).

## **Καρβαπενεμάσες**

Πρόκειται για μια ομάδα β- λακταμασών, οι οποίες δραστηριοποιούνται κατά των καρβαπενεμών αλλά και κατά των κεφαλοσπορινών(23). Η αζτρεονάμη είναι ανεπηρέαστη από τη δράση των μέταλλο- β- λακταμασών, υπάρχουν όμως κάποιες που με παραγωγή IMP και VIM προσθέτουν αντοχή σε αυτή(23).

### **Τύποι καρβαπενεμασών:**

#### **1) Μεταλλο-β-λακταμάσες**

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBL) διακρίνονται στις χρωμοσωμικές και σε εκείνες που κωδικοποιούνται από μεταβιβάσιμα γονίδια. Τα χρωμοσωμικά ένζυμα βρίσκονται σε ευκαιριακά

παθογόνα βακτήρια του περιβάλλοντος και συνήθως δεν συνδέονται με σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις. Σε αντίθεση με τις χρωμοσωμικές MBL, τα επίκτητα μεταλλο-ένζυμα παρουσιάζουν δραματική αύξηση στην ανίχνευση και στη γεωγραφική τους διασπορά. Μερικές από τις πιο σημαντικές οικογένειες είναι:

#### Τύπου IMP μέταλλο- β- λακταμάσες

Σε αυτού του τύπου τις καρβαπενεμάσες παρατηρείται διαμεσολάβηση πλασμιδίου. Εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στην Ιαπωνία (το 1990), σε Gram (-) μικροοργανισμούς όπως στα γένη *Pseudomonas spp.* και *Acinetobacter spp.* και σήμερα πλέον έχουν μεταφερθεί στην Άπω Ανατολή, στην Ευρώπη, στον Καναδά και την Βραζιλία.(20)

#### VIM μέταλλο- β- λακταμάσες

Η συγκεκριμένη ομάδα καρβαπενεμασών αναφέρθηκε στην Ιταλία το 1999, και σήμερα περιλαμβάνει 10 στελέχη τα οποία εντοπίζονται σε Ευρώπη, Αμερική και Άπω Ανατολή(24). Τα VIM ένζυμα συναντώνται κυρίως στα είδη *Pseudomonas aeruginosa* και *Pseudomonas putida*(23).

Οι παραλλαγές στην αλληλουχία αμινοξέων είναι έως και 10% στις VIM και έως 15% στις IMP, καθώς και 70% μεταξύ τους. Τα ένζυμα και των δύο τύπων καρβαπενεμασών είναι παρόμοια, και τα δύο κωδικοποιούνται από ιντεγκρόνια και μερικές φορές με τη μεσολάβηση πλασμιδίου(25). Επιπλέον, και τα δύο ένζυμα υδρολύουν όλες τις β- λακτάμες (εκτός των μονοβακταμών) και δεν επηρεάζονται από τους αναστολείς των β- λακταμασών(20).

#### NDM-1 μέταλλο- β- λακταμάσες

Το NDM-1 (New Delhi metallo-β-lactamase) περιγράφηκε πρώτη φορά στο Νέο Δελχί το 2009, αλλά πλέον είναι διαδεδομένο στην Ινδία και το Πακιστάν(26). Το ένζυμο αυτό καθιστά τα βακτήρια ανθεκτικά στα β- λακταμικά αντιβιοτικά. Το γονίδιο για το NDM-1 (*bla<sub>NDM-1</sub>*), είναι μέλος μιας μεγάλης οικογένειας γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα β- λακταμάσης, και ονομάζονται καρβαπενεμάσες. Τα πιο συνηθισμένα βακτήρια που παρατηρήθηκε το συγκεκριμένο ένζυμο είναι στην *Escherichia coli* και στην *Klebsiella pneumoniae*, αλλά το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>* μπορεί να μεταδοθεί από ένα στέλεχος των βακτηρίων σε ένα άλλο με οριζόντια γονιδιακή μεταφορά. Σύμφωνα με τα ευρήματα, το *bla<sub>NDM-1</sub>*, έχει την ιδιότητα να μεταφέρεται από βακτήριο σε βακτήριο μέσω κυκλικών μορίων DNA που ονομάζονται πλασμίδια(23).

## **2) KPC καρβαπενεμάσες**

Οι KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*) καρβαπενεμάσες ανήκουν στη μοριακή κλάση A, διαθέτουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο και αποτελούν ένζυμα που υδρολύουν μια



μεγάλη ποικιλία β-λακταμικών αντιβιοτικών, ενώ αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών. Διακρίνονται σε ένζυμα που κωδικοποιούνται από το χρωμόσωμα και σε πλασμιδικά. Οι KPC υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, περιλαμβανομένων και των ευρέως φάσματος κεφαλοσπορινών. Ανιχνεύονται πρωτίστως στην *Kl. pneumoniae* αλλά έχουν βρεθεί και σε άλλα είδη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων(5).

### 3) OXA-τύπου καρβαπενέμασες

Οι OXA-τύπου β-λακταμάσες ανήκουν στη μοριακή κλάση D. Ονομάζονται έτσι διότι υδρολύουν την οξασιλλίνη και την κλοξασιλλίνη. Γενικά, πρόκειται για ένζυμα που δεν υδρολύουν τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και ανιχνεύονται σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Οι OXA-τύπου καρβαπενέμασες υδρολύουν ασθενώς τις καρβαπενέμες και αναστέλλονται πτωχά από κλαβουλανικό οξύ. Υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες (1ης και 2ης γενιάς), ενώ δεν υδρολύουν αζτρεονάμη.

Καρβαπενέμασες κλάσης D που έχουν τυποποιηθεί είναι η OXA-24 και η OXA-40 (Πορτογαλία και Ισπανία), καθώς και η OXA-58 σε πολλές χώρες και στην Ελλάδα. Οι OXA-48 καρβαπενέμασες ανιχνεύθηκαν τελευταία σε Εντεροβακτηριακά (*K.pneumoniae*, *E.coli*) σε πολλές χώρες (Μέση Ανατολή, Ινδία, Ευρώπη, Β. Αφρική) (24). Είναι δύσκολες στην ανίχνευση διότι συχνά εκφράζουν αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Η διασπορά των OXA-48 γονιδίων σε στελέχη Εντεροβακτηριακών συνδέεται με συγκεκριμένο τύπο πλασμιδίου με υψηλή συζευκτική ικανότητα. Από το 2013 και μετά ,αρχίζουν να κάνουν την εμφάνιση τους οι OXA-48 και στην Ελλάδα, χωρίς όμως να έχουν ακόμα δημιουργήσει μεγάλο πρόβλημα.



## ΣΚΟΠΟΣ

Την τελευταία δεκαετία στελέχη στα ελληνικά νοσοκομεία παρατηρείται δραματική αύξηση στελεχών *Klebsiella pneumoniae* με αντοχή στις καρβαπενέμες. Τα συγκεκριμένα στελέχη πέρα από την αντοχή τους στις καρβαπενέμες παρουσιάζουν ταυτόχρονα αντοχή και σε άλλες τάξεις αντιμικροβιακών φαρμάκων με αποτέλεσμα να περιορίζονται οι θεραπευτικές επιλογές σε δύο μόνο αντιμικροβιακά φάρμακα, την τιγκεκυκλίνη και την κολιστίνη.

Στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας το 65% των στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που απομονώνονται από κλινικά δείγματα εμφανίζουν αντοχή στις καρβαπενέμες. Ο κύριος μηχανισμός αντοχής των στελεχών αυτών είναι η παραγωγή καρβαπενεμασών κυρίως VIM και KPC. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε κατά πόσο η παρουσία της καρβαπενεμάσης OXA - 48 ευθυνόταν για την αντοχή κάποιων στελεχών στις καρβαπενέμες.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1) Στελέχη βακτηρίων

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) όπου μελετήθηκαν συνολικά 30 στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, τα οποία εμφάνιζαν αντοχή στις καρβαπενέμες. Τα 30 αυτά στελέχη επιλέχθηκαν τυχαία σε ένα διάστημα τριών μηνών (06/2017-08/2017) και ελέχθηκαν για την παρουσία του γονιδίου *bla<sub>OXA-48</sub>*. Τα θετικά OXA48 δείγματα χαρακτηρίστηκαν στην συνέχεια με την μέθοδο του MLST, ενώ τα δείγματα που ήταν αρνητικά για το συγκεκριμένο γονίδιο ελέχθηκαν περαιτέρω για να βρεθεί η αιτία εμφάνισης αντοχής των συγκεκριμένων στελεχών.

### 2) Ταυτοποίηση στελεχών

Αρχικά συλλέχθηκαν κλινικά δείγματα ασθενών του ΠΓΝΛ και καλλιεργήθηκαν εκτός από τα κλασσικά υλικά (MacConkey) και σε χρωμογόνο εκλεκτικό υλικό, για ανίχνευση gram αρνητικών μικροβίων καρβαπενέμη-ανθεκτικών. Μετά τον εμβολιασμό στα θρεπτικά υλικά ακολουθούσε επώαση για είκοσι τέσσερις ώρες σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 37°C. Τα στελέχη που συλλέχθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως Gram αρνητικά σύμφωνα με τη χρώση Gram και ταυτοποιήθηκαν ως *Klebsiella pneumoniae* με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο ευαισθησίας. Όλα τα στελέχη τα οποία απομονώθηκαν διερευνήθηκαν παράλληλα και με μοριακές μεθόδους.

### 3) Χρώση κατά Gram

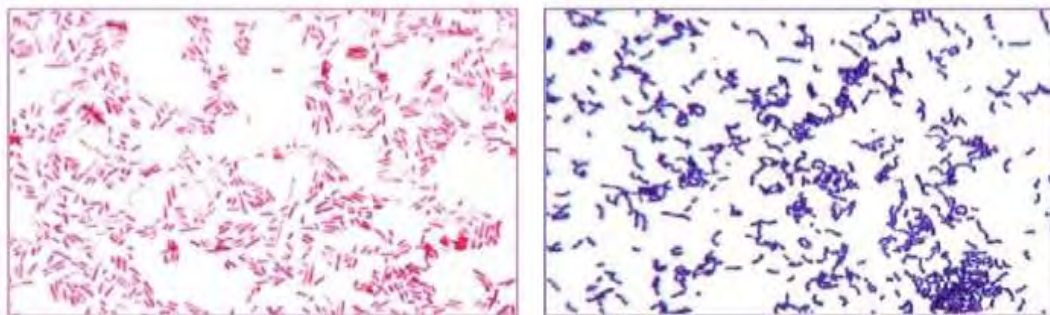
Η χρώση κατά Gram αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος. Ο μηχανισμός της χρώσης Gram συνδέεται με τη διαφορά της δομής των θετικών και αρνητικών κατά Gram κυττάρων και βασίζεται στον αποχρωματισμό που προκαλεί η αιθανόλη στους δύο τύπους κυττάρων. Τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες ή ιώδες της γεττανής και διάλυμα Lugol (ιώδιο), με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο ξεπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται, γεγονός που αποσταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη και αυξάνει τη διαπερατότητά της. Έτσι, το σύμπλοκο της χρωστικής ξεπλένεται αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο, όπως είναι η *Klebsiella pneumoniae*, το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται ερυθρόχρωο από τη σαφρανίνη. Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit με τη μεθοδολογία που ακολουθεί:

## ΥΛΙΚΑ

- WFI (Water For Injection – στείρο, απυρετογόνο H<sub>2</sub>O)
- Διάλυμα crystal violet
- Διάλυμα Lugol PVP
- Διάλυμα αποχρωματισμού (αιθανόλη και ακετόνη)
- Διάλυμα safranin
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Οπτικό μικροσκόπιο

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά τα παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Κάθε παρασκεύασμα καλύφθηκε με διάλυμα crystal violet για 1 λεπτό και έπειτα ξεπλύθηκε με νερό βρύσης. Στη συνέχεια, κάθε παρασκεύασμα καλύφθηκε με διάλυμα Lugol PVP για 1 λεπτό κι έπειτα ξεπλύθηκε με νερό βρύσης. Κάθε παρασκεύασμα αποχρωματίστηκε ξεπλένοντας την αντικειμενοφόρο πλάκα με διάλυμα decolorizing (αιθανόλη και ακετόνη) και ακολούθως μεταχρωματίστηκε καλύπτοντάς το με διάλυμα σαφρανίνης για 10 δευτερόλεπτα. Τέλος, ξεπλύθηκε με νερό βρύσης, ξηράνθηκε μεταξύ φύλλων διηθητικού χαρτιού και μικροσκοπήθηκε. Με τη διαδικασία που περιγράφηκε, τα Gram θετικά βακτήρια χρωματίζονται σκούρα ιώδη, ενώ τα Gram αρνητικά, όπως η *Klebsiella pneumoniae*, χρωματίζονται αχνά κόκκινα (εικ. ).



Εικόνα 11 Ενδεικτική εικόνα: Μέθοδος χρώσης κατά Gram ενός Gram αρνητικού βακτηρίου (αριστερά) και ενός Gram θετικού βακτηρίου (δεξιά).

#### 4) Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek-2

Στην παρούσα μελέτη ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη *Kl.pneumoniae* με χρήση του αυτόματου συστήματος Vitek-2 της Biomerieux. Πρόκειται για ένα καινοτόμο σύστημα, το οποίο χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στα νοσοκομεία τόσο για τη γρήγορη και ακριβή ταυτοποίηση των βακτηρίων, όσο και για τον έλεγχο της

ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά. Το σύστημα περιλαμβάνει μία εκτεταμένη βάση δεδομένων αναγνώρισης, με διαθέσιμη την πιο αυτοματοποιημένη πλατφόρμα για γρήγορα αποτελέσματα, καθώς και βελτίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Ο ταχύς χρόνος απόκρισης συνεπάγεται την πιο γρήγορη και άμεση διεξαγωγή των αποτελεσμάτων σε σχέση με οποιαδήποτε χειροκίνητη τεχνική ταυτοποίησης και ελέγχου της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των βακτηρίων.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, κατά τον έλεγχο αντοχής ή ευαισθησίας των υπό μελέτη στελεχών *Kl.pneumoniae* στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις καρβαπενέμες.

## 5) Απομόνωση DNA

Μετά την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των υπό μελέτη στελεχών της παρούσας εργασίας ακολούθησε η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA τους. Το DNA είναι η απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της μοριακής ιατρικής και κατ' επέκταση της μοριακής μικροβιολογίας και η απελευθέρωσή του σε διαλυτή μορφή, μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων, όπως είναι οι πυρήνες, αποτελεί την προϋπόθεση για κάθε περαιτέρω διαδικασία. Ο τρόπος απομόνωσης περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

### ΥΛΙΚΑ

1. εναιώρημα αποικιών *Kl.pneumoniae*
2. αυτόματες πιπέτες
3. φυγόκεντρος
4. vortex
5. στήλη Zymo-Spin™ Column
6. σωληνάκι περισυλλογής Collection Tube
7. σωληνάκι μικροφυγοκέντρωσης (microcentrifuge tube)
8. Genomic Lysis Buffer
9. DNA Pre-Wash Buffer
10. gDNA Wash Buffer
11. Elution Buffer

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η απομόνωση του βακτηριακού DNA έγινε με χρήση του kit Quick-gDNA<sup>TM</sup> MiniPrep (Zymo Research). Το πρωτόκολλο σχεδιάστηκε για μέχρι 200μL δείγματος βιολογικού υγρού και κυτταρικών εναιωρημάτων, που περιέχουν λιγότερα από  $5,0 \times 10^6$  κύτταρα, καθώς και λυμάτων (κυττάρων) που έχουν εξαχθεί από δείγματα ύστερα από πέψη με πρωτεΐναση K. Χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα αποικιών *Klebsiella pneumoniae* το οποίο φωτομετρήθηκε ώστε η θολρότητα να είναι ~2 McFarland. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν έχουν ως εξής:

1. Προσθήκη 800μL Genomic Lysis Buffer σε 200μL υγρού δείγματος. Σύντομη ανάδευση στο vortex. Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά.
2. Μεταφορά του μείγματος σε μια στήλη Zymo-Spin<sup>TM</sup> Column τοποθετημένη σε ένα σωληνάκι περισυλλογής Collection Tube. Φυγοκέντρηση στις 11,900 στροφές για 1 λεπτό. Απόρριψη του υγρού που εισέρρευσε από τη στήλη μαζί με το σωληνάκι περισυλλογής. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάκι περισυλλογής.
3. Προσθήκη 200μL DNA Pre-Wash Buffer στη στήλη περιστροφής (Spin Column). Φυγοκέντρηση στις 11,900 στροφές για 1 λεπτό.
4. Προσθήκη 500μL gDNA Wash Buffer στη στήλη περιστροφής. Φυγοκέντρηση στις 11,900 στροφές για 1 λεπτό. Μεταφορά της στήλης σε ένα καθαρό σωληνάκι μικροφυγοκέντρωσης (microcentrifuge tube).
5. Προσθήκη 50μL DNA Elution Buffer. Επώαση για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να εκλουστεί το DNA. Χρησιμοποιείται άμεσα ή αποθηκεύεται στους -20°C.

## **6) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μία βιοχημική *in vitro* αντίδραση, η οποία επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA-στόχου. Αναπτύχθηκε από τον Kary B. Mullis το 1983, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993 και είναι μία θεμελιώδης και συγχρόνως απλή μέθοδος ενίσχυσης ή αύξησης του αριθμού των ειδικών νουκλεϊκών θραυσμάτων σε ένα δείγμα.

Η PCR ως τεχνική κατέστη δυνατή με τη χρήση θερμοανθεκτικής DNA-πολυμεράσης για την ενίσχυση ειδικών τμημάτων DNA σε ένα δείγμα, εντός του οποίου βρίσκονται και διαφορετικά μόρια DNA, εκτός του DNA-στόχου. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η PCR βρήκε θαυμάσια εφαρμογή στην μικροβιολογία, τόσο για την τυποποίηση και την επιδημιολογική μελέτη των μικροοργανισμών, όσο και για τη βασική έρευνα, η οποία τα

τελευταία χρόνια γνωρίζει θεαματική ανάπτυξη. Η PCR, ως ειδική και ευαίσθητη μέθοδος, χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων βακτηρίων και ιών, αλλά και μυκήτων και παρασίτων, τόσο σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, όσο και σε δείγματα τροφίμων. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη των αντιδραστηρίων της PCR σε εμπορικά kits, η αύξηση της σύνθεσης ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων με χαμηλό κόστος, η αύξηση των διαθέσιμων πληροφοριών για ειδικές αλληλουχίες DNA, μέσω τεχνικών αλληλούχισης (sequencing), επέτρεψε την επίλυση αρχικών προβλημάτων εφαρμογής της μεθόδου στα διαγνωστικά και ερευνητικά εργαστήρια.

### **Βασικές αρχές της μεθόδου**

Η πολλαπλή αντιγραφή ή ενίσχυση (amplification) του DNA κατέχει κεντρική θέση στις μελέτες της Μοριακής Ιατρικής. Η πολλαπλή αντιγραφή του DNA *in vitro* επικεντρώνεται στην επιδιωκόμενη αύξηση του αριθμού των αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Για την επίτευξη αυτού του στόχου απαιτούνται:

- i. **ένα μητρικό μόριο DNA**, το οποίο αποτελεί την αλληλουχία-στόχο που πρέπει να ενισχυθεί ή να πολλαπλασιαστεί. Η γνώση της αλληλουχίας του DNA-στόχου αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό σημείο.
- ii. **μία DNA πολυμεράση**, δηλαδή το ένζυμο που θα επιτελέσει τα επαναλαμβανόμενα βήματα του πολλαπλασιασμού. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) εντός της DNA αλυσίδας. Είναι ένζυμα γνωστά για τον ρόλο τους στη αντιγραφή του DNA, κατά την οποία η DNA-πολυμεράση «διαβάζει» την άθικτη αλυσίδα DNA, την οποία χρησιμοποιεί ως πρότυπο για τη σύνθεση νέας αλυσίδας DNA. Η δράση της πολυμεράσης ασκείται στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας και επιμήκυνση γίνεται στην κατεύθυνση 5'- 3'. Στη βιολογική δράση αρκετών πολυμερασών, αλλά όχι όλων, συμπεριλαμβάνεται και η επιδιόρθωση των λαθών κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA (proofreading).
- iii. **αλληλουχίες πολλαπλασιασμού ή εκκινήτες (*primers*)**, δηλαδή ειδικά ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πριν και μετά τον DNA-στόχο και λειτουργούν ως σημείο εκκίνησης της σύνθεσης των αντιγραφόμενων κλώνων του DNA.
- iv. **νουκλεοτίδια (*dNTPs*)**, τα οποία είναι ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) απαραίτητα για τη σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση(27).



Η μέθοδος PCR εξελίσσεται σε συγκεκριμένους κύκλους αντιδράσεων. Σε κάθε κύκλο αντίδρασης η ολοκλήρωση του προηγούμενου σταδίου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ικανοποιητική ολοκλήρωση του επόμενου. Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία στάδια:

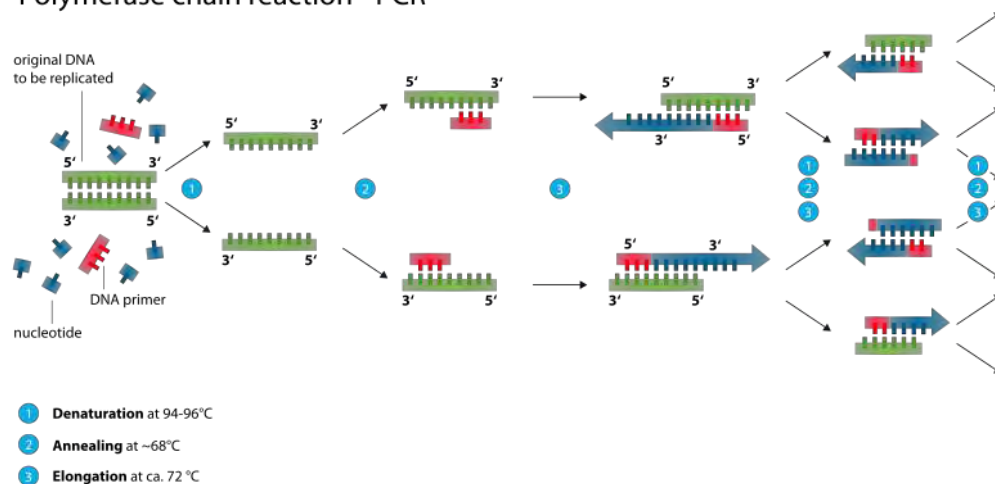
1. **Στάδιο αποδιάταξης (*denaturation*)** του DNA, το οποίο πραγματοποιείται με θέρμανση του μείγματος μέχρι περίπου στους 95°C, για την αποδιάταξη τόσο του DNA-στόχου, όσο και των εκκινητών, που πρέπει να βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή.

2. **Στάδιο αναδιάταξης ή ανασύνδεσης ή υβριδισμού (*annealing*)** των εκκινητών, κατά το οποίο πραγματοποιείται αντίδραση υβριδισμού μεταξύ των εκκινητών και των συμπληρωματικών τμημάτων του DNA-στόχου. Κατά τη διάρκεια του σταδίου ανασύνδεσης το μείγμα της αντίδρασης κυμαίνεται σε θερμοκρασία από 40°C έως 70°C. Στο στάδιο αυτό ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του ενός κλώνου, ενώ ο άλλος εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του άλλου κλώνου.

3. **Στάδιο επιμήκυνσης (*extension*)**, κατά το οποίο πραγματοποιείται συνεχής επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) συμπληρωματικών προς την αλληλουχία-στόχο. Η διαδικασία επιμήκυνσης επιτελείται από μία DNA πολυμεράση. Η συνήθης θερμοκρασία του σταδίου επιμήκυνσης είναι περίπου 72°C.

Μετά από κάθε κύκλο σύνθεσης το DNA θερμαίνεται, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί ξανά και να βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και σύνθεσης του DNA επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Κάθε νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση επόμενων αλυσίδων. Με τη συμπλήρωση του πρώτου κύκλου το DNA-στόχος διπλασιάζεται και ακολούθως ο πολλαπλασιασμός εξελίσσεται εκθετικά. Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει 30-40 θερμικούς κύκλους.

#### Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 12 Σχηματικά η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)



Η διεργασία της PCR διευκολύνθηκε πολύ με την ανακάλυψη και χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών, όπως της *Taq* DNA πολυμεράσης. Το θερμοανθεκτικό αυτό ένζυμο απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq*), το οποίο ζει σε θερμές πηγές με μέση θερμοκρασία 70°C έως 75°C. Το ένζυμο εμφανίζει δραστικότητα 800 bp/min στους 75°C και διάρκεια ημιζωής 40 λεπτών στους 95°C, με αποτέλεσμα να αντέχει σε συνεχείς αυξομειώσεις της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων θερμικών κύκλων της PCR. Έτσι, το ένζυμο χρησιμοποιείται ευρέως, καθώς εξυπηρετεί την παρατεταμένη επώαση στους 95°C, δεν καταστρέφεται στο στάδιο της αποδιάταξης και δε χρειάζεται να αντικαθίσταται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Επιπλέον, η εκτέλεση των αντιδράσεων ανασύνδεσης και επέκτασης σε υψηλότερες θερμοκρασίες μειώνει τον πολλαπλασιασμό των μη ειδικών προϊόντων. Μειονέκτημα του ενζύμου *Taq* DNA πολυμεράση αποτελεί το γεγονός ότι δεν διαθέτει μηχανισμό διορθωτικής ανάγνωσης(27).

Το γεγονός ότι η τεχνική της PCR περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων σταδίων, οδήγησε στην αυτοματοποίηση του συνόλου της μεθόδου με τη δημιουργία θερμικών κυκλοποιητών και δυνατότητα προγραμματισμού των διαφόρων αντιδράσεων, ώστε μετά από ρύθμιση των επιθυμητών θερμοκρασιών και χρόνων, η διαδικασία να εκτελείται αυτόματα, χωρίς την παρέμβαση του χειριστή ή την ανάγκη προσθήκης αντιδραστηρίων.



Εικόνα 13 Μηχάνημα για PCR

## Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου PCR

Η τεχνική της PCR παρουσιάζει τρία κύρια πλεονεκτήματα:

**α) χρόνος:** με τη χρήση της PCR είναι δυνατό να παραχθούν περισσότερα από  $10^5$  αντίγραφα ενός τμήματος DNA, εντός λίγων ωρών. Τα στάδια της αποδιάταξης διαρκεί 1 λεπτό, το στάδιο της ανασύνδεσης των εκκινητών 3-5 λεπτά και το στάδιο της επιμήκυνσης 1-5 λεπτά. Έτσι, για περίπου 30 κύκλους μίας αντίδρασης PCR απαιτούνται μόλις 3-6 ώρες.

**β) ισχύς:** η PCR έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζει τμήματα DNA που έχουν υποστεί εκτεταμένη αποικοδόμηση λόγω της επίδρασης του χρόνου ή άλλων αιτιών, ή βρίσκονται σε μη προσπελάσιμες θέσεις, όπως σε μονιμοποιημένους ιστούς.

**γ) ευαισθησία:** η PCR παράγει αντίγραφα του DNA-στόχου σε ποσότητες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, εάν υπάρχει έστω και ένα αντίγραφο αυτού. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι που κατέστησε την PCR τόσο διαδεδομένη σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών εφαρμογών.

Εντούτοις, παρά τα ελκυστικά χαρακτηριστικά της PCR, η απόδοση της μεθόδου κρίνεται πολλές φορές, ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής της, μη αποδεκτή για τον πολλαπλασιασμό του DNA. Οι περιορισμοί της PCR εντοπίζονται στα εξής σημεία:

**α) αλληλουχία-στόχος:** είναι απαραίτητη η ακριβής γνώση της αλληλουχίας-στόχου, ώστε να συντεθούν οι εκκινητές. Επιπρόσθετα, σημαντικός περιορισμός της μεθόδου αποτελεί και το μέγεθος των DNA-στόχων, οι οποίοι μπορούν να ενισχυθούν με αξιοπιστία. Στις αλληλουχίες με μέγεθος έως 5kb η ενίσχυση θεωρείται γενικά αξιόπιστη, αλλά η ενίσχυση είναι πιο αξιόπιστη σε αλληλουχίες με μήκος 200-1000 βάσεων.

**β) δράση της *Taq* πολυμεράσης:** η *Taq* πολυμεράση δεν ασκεί πάντα τη δράση της με απόλυτη ακρίβεια, αφού σε ποσοστό έως και 40% των νεοσυντιθέντων κλώνων μπορεί να περιλαμβάνεται κάποιο σφάλμα στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που εισάγονται με τη βοήθεια του ενζύμου. Αυτό οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στην έλλειψη μηχανισμού διόρθωσης (*proofreading*). Συνήθως, το σφάλμα αφορά στην αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου. Επομένως, το τελικό μείγμα της αντίδρασης θα περιέχει μεγάλο ποσοστό αντιγράφων τα οποία είναι σχεδόν όμοια, αλλά όχι απολύτως όμοια μεταξύ τους. Με τρόπο ανάλογο πολλαπλασιάζονται και οι επιμολύνσεις του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα την ενίσχυση μη επιθυμητών αλληλουχιών.

**γ) εκκινητές:** οι εκκινητές πρέπει να έχουν μήκος 20-30 νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, η αλληλουχία των εκκινητών δεν πρέπει να περιλαμβάνει επαναλήψεις νουκλεοτιδίων σε σειρά, κυρίως λόγω της συχνής παρουσίας τους στο γονιδίωμα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ειδικότητα της πολλαπλής αντιγραφής. Παράλληλα, θα πρέπει να διασφαλίζεται η απουσία συμπληρωματικότητας μεταξύ των εκκινητών, καθώς το αντίθετο μειώνει την αποδοτικότητα

της πολλαπλής αντιγραφής, ενώ τέλος, τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR εξαρτώνται άμεσα από την ποιότητα και την καθαρότητα των εκκινητών (27).

#### ΥΛΙΚΑ

- 1) DNA βακτηρίου
- 2) WFI (Water For Injection – στείρο απυρετογόνο H<sub>2</sub>O)
- 3) Taq DNA πολυμεράση 5u/μL
- 4) 10x Taq Buffer με KCl (ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης)
- 5) MgCl<sub>2</sub>: 50 mM
- 6) Primer 1: 100 pmol/μL
- 7) Primer 2: 100 pmol/μL
- 8) Μείγμα dNTPs: 100mM
- 9) DNA Engine Peltier Thermal Cycler
- 10) Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II
- 11) Αυτόματος αναδευτήρας Vortex
- 12) Σωληνάρια eppendorf για PCR
- 13) Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες) 1000μL, 200μL, 20μL
- 14) Αποστειρωμένα ρύγχη

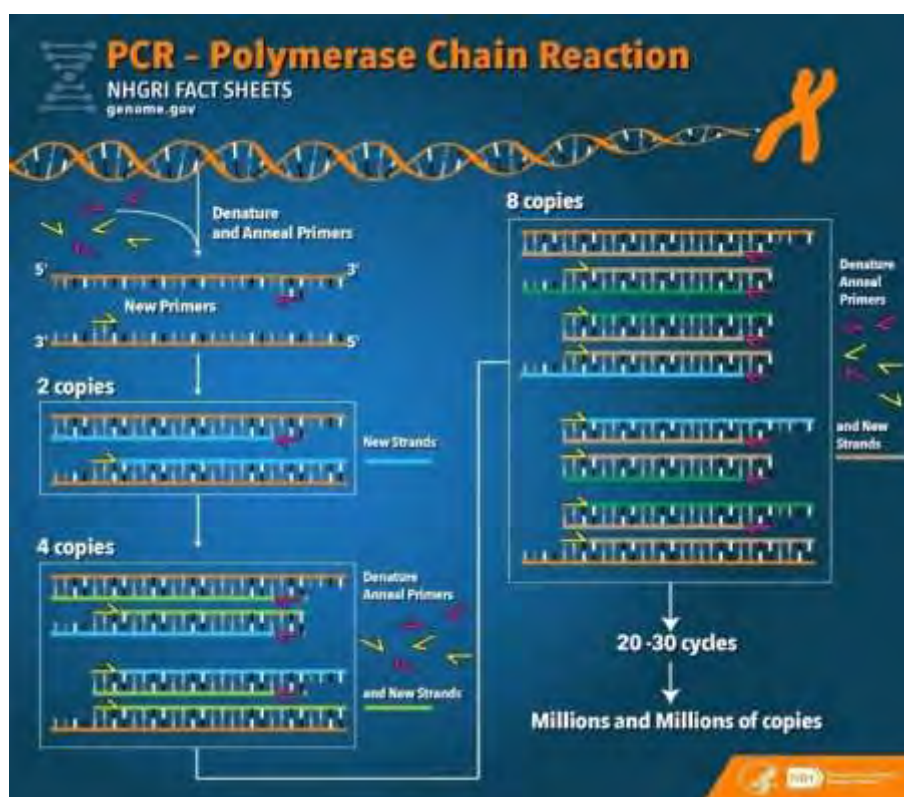
#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την εκτέλεση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης παρασκευάζεται το μείγμα έκαστης αντίδρασης αναμιγνύοντας σε eppendorf ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένων του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα της αντίδρασης) από τις αντίστοιχες βασικές ποσότητες των εξής αντιδραστηρίων: DNA βακτηρίου, Taq DNA πολυμεράση, 10x Taq Buffer με KCl, MgCl<sub>2</sub>, primer 1, primer 2, μείγμα dNTPs και WFI. Η ακριβής σύνθεση του μείγματος της αντίδρασης της PCR για τελικό όγκο αντίδρασης 25μL αναφέρεται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
10x Taq Buffer με KCl	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,75
Μείγμα dNTPs (20mM)	0,5
Primer 1 (25 pmol/μL)	0,25

Primer 2 (25 pmol/μL)	0,25
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0,2
dH <sub>2</sub> O	18,05
DNA βακτηρίου	2,5
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>25</b>

Τα 2,5 μL από κάθε δείγμα βακτηριακού DNA προστίθενται στο τέλος σε κάθε erpendorf και όλα τα erpendorf τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή σε πρόγραμμα της επιλογής του χειριστή, αναλόγως της αντίδρασης.



Εικόνα 14 Συνοπτική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Τα υπό μελέτη γονίδια που ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR ήταν τα *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>*. Οι αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών	Προϊόν	Συνθήκες PCR	
<b>OXA-48</b>	OXA-48 F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	743bp	1. 95 oC: 5min 2. 94 oC: 30sec 3. 54 oC: 1min 4. 72 oC: 2min 5. 72 oC:10min	35 cycles
	OXA-48 R	GAGCACTTCTTTTGATGGC			
<b>KPC</b>	KPC1	TCGCTAAACTCGAACAGG	800bp	1. 95oC:5min 2. 94oC:30sec 3. 55oC:30sec 4. 72oC:1min 5. 72oC:10min	30 cycles
	KPC2	TTAGTGCCCGTTGACGCCCAATCC			
<b>NDM</b>	NDMF	TGGCAGGACACTTCCTATC	500bp	1. 95oC:5min 2. 95oC:30sec 3. 50oC:30sec 4. 72oC:1min 5. 72oC:10min	30cycles
	NDMR	AGATTGCCGAGCGAGCGACTTG			
<b>VIM</b>	VIMF	AGTGGTGAGTATCCGACA	261bp	1. 95oC:5min 2. 94oC:1min 3. 56oC:1min 4. 72oC:1min 5. 72oC:10min	35 cycles
	VIMR	ATGAAAGTGCGTGGAGAC			

Πίνακας 1 Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>*

Κατά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν, ώστε να διαπιστωθεί η επιτυχής ενίσχυση των γονιδίων.

## 7) Μοριακή Τυποποίηση με την μέθοδο Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Κεντρικό σημείο στην εφαρμογή της μοριακής μεθόδου MLST αποτελεί η παροχή ενημερωμένων βάσεων δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, στις οποίες η πρόσβαση είναι ελεύθερη. Αυτές οι βάσεις δεδομένων αποτελούν τη βάση μίας κοινής γλώσσας για τη μοριακή τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών σε διεθνές επίπεδο.

Η μέθοδος MLST χρησιμοποιεί, ως μέσο για την ανάλυση της αλληλουχίας DNA, επτά γονίδια βασικού μεταβολισμού, τα οποία εδράζονται στο χρωμόσωμα των βακτηρίων και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε απαραίτητες μεταβολικές αντιδράσεις. Τα γονίδια αυτά, τα οποία αποκαλούνται και γονίδια κυτταρικής οικονομίας ή διατηρημένα γονίδια (housekeeping genes), βρίσκονται σε όλα τα βακτηριακά κύτταρα, δεν υπόκεινται σε πίεση επιλογής και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες τυποποίησης, καθώς και σε μελέτες φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών ενός είδους βακτηρίου.

Για κάθε είδος βακτηρίου έχουν επιλεγεί συγκεκριμένα γονίδια και η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την απομόνωση του μικροοργανισμού, την ταυτοποίησή του σε επίπεδο είδους, την απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά κύτταρα και την ενίσχυση, μέσω



της PCR, ενός εσωτερικού τμήματος (internal fragment) του επιλεγέντος γονιδίου μήκους περίπου 450 bp, διαδικασία που ακολουθήθηκε και κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας. Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές για κάθε είδος γονιδίου και η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Μετά την ενίσχυση των εσωτερικών τμημάτων των γονιδίων ακολουθεί η αλληλούχισή τους (sequencing). Το είδος των γονιδίων που μελετώνται για κάθε βακτήριο, οι ειδικοί εκκινητές και τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται έχουν επιλεγεί μετά από μελέτες και παρατίθενται στην ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων MLST, έτσι ώστε όλοι οι ερευνητές διεθνώς να αναφέρονται στα ίδια τμήματα των DNA-στόχων. Για κάθε γονίδιο βασικού μεταβολισμού οι διαφορετικές αλληλουχίες προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλλήλια (alleles) και σημαίνονται με έναν αριθμό. Τα αλλήλια τα οποία παρουσιάζουν έστω και μία διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά. Κάθε βακτηριακό στέλεχος χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό των αλληλίων (*allelic profile*) των επτά χρησιμοποιούμενων γονιδίων μεταβολισμού και κατατάσσεται σε έναν συγκεκριμένο, μοναδικό τύπο αλληλουχιών (*Sequence Type, ST*). Ο ST αποτελεί έναν κατάλληλο, αξιόπιστο και ακριβή τρόπο χαρακτηρισμού ενός στελέχους ή ενός κλώνου βακτηρίου. Τα στελέχη του ίδιου είδους με ίδιο ST αποτελούν μέλη του ίδιου κλώνου.

Όλες οι σχετικές με τη μοριακή μέθοδο MLST πληροφορίες, όπως οι αλληλουχίες αναφοράς των αλληλίων, οι ST τύποι, καθώς και επιδημιολογικά δεδομένα είναι καταχωρημένα στην επίσημη διαδικτυακή βάση δεδομένων της τεχνικής MLST [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org).

Στην παρούσα μελέτη όλα τα OXA48 (+) στελέχη *Kl. pneumoniae* τυποποιήθηκαν μοριακά με τη μέθοδο MLST. Για το σκοπό αυτό σε κάθε στέλεχος τα επτά γονίδια μεταβολισμού της *Kl. pneumoniae* που ανιχνεύονται στη μέθοδο MLST (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR. Για κάθε γονίδιο της MLST που διερευνήθηκε παρασκευάστηκαν ξεχωριστά μείγματα αντίδρασης με εκκινητές ειδικούς για το κάθε γονίδιο. Όλες οι αντιδράσεις PCR προγραμματίστηκαν και εκτελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή, ενώ η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *Taq* DNA πολυμεράση.

Το προϊόν του κάθε γονιδίου, οι αλληλουχίες των εκκινητών, καθώς και οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των στελεχών *Kl. pneumoniae* με την μέθοδο MLST αναφέρονται παρακάτω:

Γονίδιο	Προϊόν	Εκκινητές	Αλληλουχίες 5'-3'	Συνθήκες PCR*	Προϊόν
gapA	3-φωσφορική αφυδρογονάση της γλυκεριναλδεϋδης	gapA : F : 173	TGA AAT ATG ACT CCA CTC ACG G	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	450bp
		gapA : R : 181	CTT CAG AAG CGG CTT TGA TGG CTT		
infB	Παράγοντας 2 (IF-2) της έναρξης της μετάφρασης	infB : 1F	CTC GCT GCT GGA CTA TAT TCG	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)50°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	317bp
		infB : 1R	CGC TTT CAG CTC AAG AAC TTC		
mdh	αφυδρογονάση του μηλικού	mdh : F : 130	CCC AAC TCG CTT CAG GTT CAG	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	477bp
		mdh : R : 867	CCG TTT TTC CCC AGC AGC AG		
pgi	φωσφογλυκοζοϊσομεράση	pgi : F : 1R	GAG AAA AAC CTG CCT GTA CTG CTG GC	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	432bp
		pgi : R : 1F	CGC GCC ACG CTT TAT AGC GGT TAA T		
phoE	φωσφορίνη	phoE : F : 604.1	ACC TAC CGC AAC ACC GAC TTC TTC GG	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	420bp
		phoE : R : 604.2	TGA TCA GAA CTG GTA GGT GAT		
rpoB	β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης	rpoB : F : Vic3	GGC GAA ATG GCW GAG AAC CA	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	501bp
		rpoB : R : Vic2	GAG TCT TCG AAG TTG TAA CC		
tonB	Περιπλασματικός μετατροπέας ενέργειας	tonB: 1F	CTT TAT ACC TCG GTA CAT CAG GTT	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	414bp
		tonB: 2R	ATT CGC CGG CTG RGC RGA GAG		

\* Σε όλα τα γονίδια τα βήματα 2,3 και 4 της PCR επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους.

Πίνακας 2 Τα γονίδια, οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των στελεχών *Kl. pneumoniae* με την μέθοδο MLST

## 8) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Η μέθοδος που εφαρμόζεται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση θραυσμάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης. Πρόκειται για μία απλή και γρήγορη τεχνική, ικανή να διαχωρίζει μείγματα θραυσμάτων DNA, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες μεθόδους.

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, τα θραύσματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αгарόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αгарόζης εξαρτάται κυρίως από



τέσσερις παραμέτρους: 1) το μέγεθος του DNA, 2) τη συγκέντρωση της αγαρόζης, 3) τη στερεοδιάταξη του DNA και 4) την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φως και με τη χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, μίας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% για την ηλεκτροφόρηση όλων των προϊόντων PCR. Για κάθε προϊόν PCR πραγματοποιήθηκαν δύο ηλεκτροφορήσεις, μία μετά από κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε και μία μετά τον καθαρισμό του DNA (περιγράφεται παρακάτω). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

#### ΥΛΙΚΑ

- WFI (Water For Injection – στείρο, απυρετογόνο H<sub>2</sub>O για τις αραιώσεις)
- 10x TBE Buffer (Tris-Boric Acid-EDTA)
- Agarose SeaKem LE
- Ethidium bromide (EtBr) solution 10 mg/ml
- 6x DNA Loading Dye Solution – κυανό της βρωμοφαινόλης
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder
- Λάμπα UV
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό τάσης
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Κωνική φιάλη 250 ml
- Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος
- Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη και parafilm

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά πραγματοποιείται αραιώση του 10x TBE Buffer σε συγκέντρωση 1x, με ανάμειξη 100 ml 10x TBE και 900 ml H<sub>2</sub>O (WFI). Σε κωνική φιάλη των 250 ml αναμειγνύονται 100 ml 1x TBE Buffer και 2 g αγαρόζης, ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2% w/v. Το διάλυμα αναμειγνύεται ζωηρά με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης και στη συνέχεια θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει το διάλυμα διανέγες. Στη συνέχεια, αφήνεται να κατέβει η θερμοκρασία περίπου στους 55°C, ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο. Έπειτα, προστίθενται 2μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), ώστε

να έχει τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml στο διάλυμα. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Το διάλυμα αгарόζης αποχύνεται στο εκμαγείο και αφού σταθεροποιηθεί είναι πλέον έτοιμο για την ηλεκτροφόρηση του DNA, με εμβάπτισή του σε διάλυμα 1x TBE Buffer της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Αναμειγνύονται 5µl από ένα δείγμα DNA με 2µl χρωστικής Loading Dye Solution (κυανό της βρωμοφαινόλης) και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα βυθίσματα του πήκτωματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους και για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 120 Volts και ένταση 400 mA για 30 με 40 λεπτά. Το ηλεκτροφορηθέν πήκτωμα αгарόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός και φωτογραφήθηκε με ειδική κάμερα που είναι ενσωματωμένη στη συσκευή.

## 9) Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για τα γονίδια *bla<sub>OXA-48</sub>* και το MLST, για την απομάκρυνση των προσμείξεων της αντίδρασης είναι απαραίτητος ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισής τους. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα DNA σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

### ΥΛΙΚΑ

- Binding Buffer (B<sub>2</sub>)
- Wash Buffer (W<sub>1</sub>)
- Elution Buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (E<sub>1</sub>)
- Στήλες φυγοκέντρωσης με σωληνάρια συλλογής
- Σωλήνες έκλουσης (1.7 ml)
- Ισοπροπανόλη 100%
- Αιθανόλη 96% - 100%
- Φυγόκεντρος Mini Spin (για σωληνάρια τύπου eppendorf)
- Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη σιφωνίων

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ο καθαρισμός του DNA επιτελείται σε τρία στάδια:

**1) Δέσμευση του DNA:** Σε ένα δείγμα PCR προστίθεται τετραπλάσιος όγκος αραιωμένου Binding Buffer (B<sub>2</sub>), σε σχέση με τον όγκο του προϊόντος της PCR. Το μείγμα

αναδεύεται καλά με αναρρόφηση. Στη συνέχεια το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη φυγοκέντρησης PureLink PCR, όπου και δεσμεύεται το DNA στη στήλη, φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 11.000 rpm και απορρίπτεται το διήθημα.

**2) Καθαρισμός του DNA:** Σε κάθε στήλη προστίθενται 650 μl του αραιωμένου με αιθανόλη Wash Buffer ( $W_1$ ), το μείγμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 11.000 rpm και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα. Στην συνέχεια ακολουθεί επαναφυγοκέντρωση κάθε στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.400 rpm), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer. Έκαστη στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα έκλουσης PureLink (1.7 ml), ενώ οι προηγούμενοι σωλήνες συλλογής του διηθήματος απορρίπτονται.

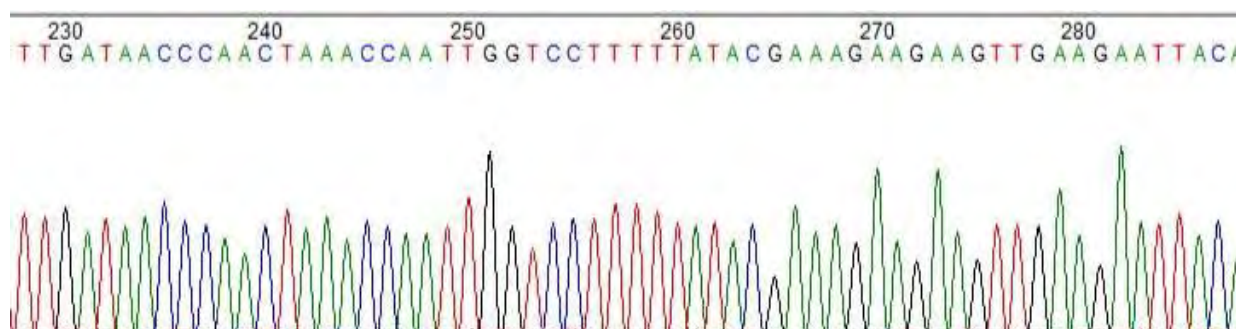
**3) Έκλυση του DNA:** Προστίθενται 40μl Elution Buffer ( $E_1$ ) στο κέντρο κάθε στήλης προσεκτικά, ώστε η στήλη να διαβραχεί και κατόπιν να αποδεσμευτεί όλη η ποσότητα του DNA από τη στήλη. Στη συνέχεια, οι στήλες φυγοκεντρούνται για 4 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13.400 rpm). Έκαστη στήλη απορρίπτεται και το διήθημα που απομένει περιέχει πλέον το καθαρισμένο προϊόν της PCR, το οποίο και ηλεκτροφορείται, σύμφωνα με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης που περιγράφηκε παραπάνω, για επιβεβαίωση της ύπαρξης και της ποιότητάς του μετά τη διαδικασία του καθαρισμού. Τέλος, τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να αποσταλούν για αλληλούχιση του DNA τους (Sequencing).

## **10) Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων *bla<sub>OXA-48</sub>* και του MLST (Sequencing)**

Η αλληλούχιση του DNA των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* και για τα γονίδια του MLST πραγματοποιήθηκε σε ειδικό εξωτερικό εργαστήριο. Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης αποστέλλονταν στο Εργαστήριο 40 μl από το προϊόν ενίσχυσης του DNA και 20 μl από έναστο εκκινητή σε αραιώση 1:20 (συγκέντρωση 5 pmol/μl). Σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη *Kl. pneumoniae* της παρούσας εργασίας ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε και στις δύο έλικες των γονιδιακών θραυσμάτων, δηλαδή τόσο από την 5' κατεύθυνση του προϊόντος ενίσχυσης όσο και από την 3' κατεύθυνση, για μεγαλύτερη ακρίβεια.

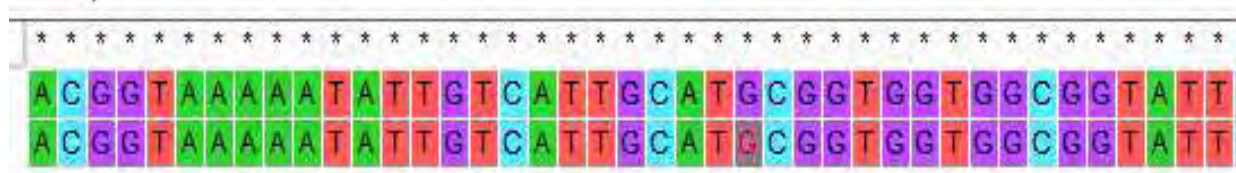
Το αποτέλεσμα της ανάλυσης της αλληλουχίας των μελετώμενων γονιδίων παρουσιάζεται με τη μορφή ενός ηλεκτροφερογράμματος (electropherogram), το οποίο αποτελείται από μία σειρά κορυφών. Κάθε κορυφή (peak) αντιστοιχεί σε μία από τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις του DNA (**A**: Αδερίνη, **T**: Θυμίνη, **G**: Γουανίνη, **C**: Κυτοσίνη) και εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα, ανάλογα με το χρώμα φθορισμού (εικόνα). Πιο συγκεκριμένα, στο ηλεκτροφερόγραμμα

αναπαρίσταται η ένταση των φθοριζόντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 15 Ενδεικτικό ηλεκτροφερόγραμμα τμήματος ενός γονιδίου MLST για την *Kl.pneumoniae*.

Η επεξεργασία των αλληλουχιών των γονιδιακών θραυσμάτων, καθώς και η στοίχιση-ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequence alignment) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Mega 7.0. (εικόνα). Η επεξεργασία αυτή καθιστά τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώσιμες και συγκρίσιμες.



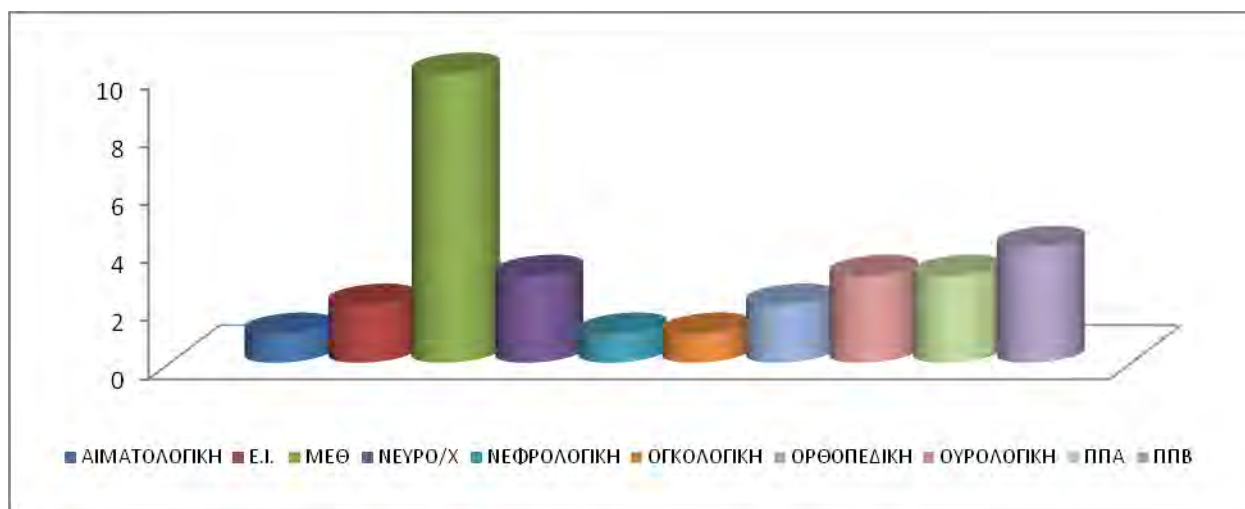
Εικόνα 16 Ενδεικτική εικόνα: στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των δύο ελίκων DNA ενός γονιδίου της MLST για *Kl.pneumoniae*, με χρήση του προγράμματος Mega 7.0.

Μετά την επεξεργασία και τη μελέτη αλληλούχισης των νουκλεοτιδίων κατέστη πλέον γνωστή η ακριβής αλληλουχία καθενός από τα επτά διατηρημένα γονίδια του τυποποιημένου σχήματος της MLST, για όλα τα υπό μελέτη στελέχη *Kl.pneumoniae*. Στη συνέχεια, για τον καθορισμό των τύπων MLST η αλληλουχία των επτά γονιδίων συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες αλληλουχίες αναφοράς της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων της MLST και ανάλογα με τις διαφορές, τους αποδόθηκε ένας αριθμός αλληλόμορφου. Οι επτά αριθμοί που προέκυψαν από τη σύγκριση των αλληλουχιών, αντιστοιχώντας στα επτά γονίδια της MLST, αποτέλεσαν το χαρακτηριστικό αλληλόμορφο προφίλ (*allelic profile*) για κάθε στέλεχος *Kl. pneumoniae* το οποίο υποβλήθηκε στη βάση δεδομένων της MLST ([www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org)) και για κάθε μοναδικό συνδυασμό αποδόθηκε ένας αντίστοιχος αριθμός, ο οποίος αποτέλεσε τον τύπο αλληλουχίας (*Sequence Type*, ST) για κάθε στέλεχος. Μέσω της μεθόδου τυποποίησης MLST, η οποία κατέληξε στον καθορισμό του χαρακτηριστικού τους ST, τα υπό μελέτη στελέχη *Kl. pneumoniae* χαρακτηρίστηκαν με αξιοπιστία και ακρίβεια.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μελετήθηκαν συνολικά 30 καρβαπενέμη-ανθεκτικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae*. Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν από τον Ιούνιο του 2017 έως και τον Αύγουστο του 2017.

Οι καλλιέργειες έγιναν από δείγματα αίματος, βρογχικών εκκρίσεων, ούρων, πτυέλων, τραυμάτων, καθετήρα, εγκεφαλονωτιαίου υγρού, πύου και ιστού και προήλθαν από τις κλινικές: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), Ορθοπαιδική, Αιματολογική, Νεφρολογική, Ουρολογική, Παν.Παθ.Α, Παν.Παθ.Β, Νευροχειρουργική, και Ογκολογική, καθώς και από τα Εξωτερικά Ιατρεία.



Εικόνα 17 Κατανομή ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *K.pneumoniae* ανά κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

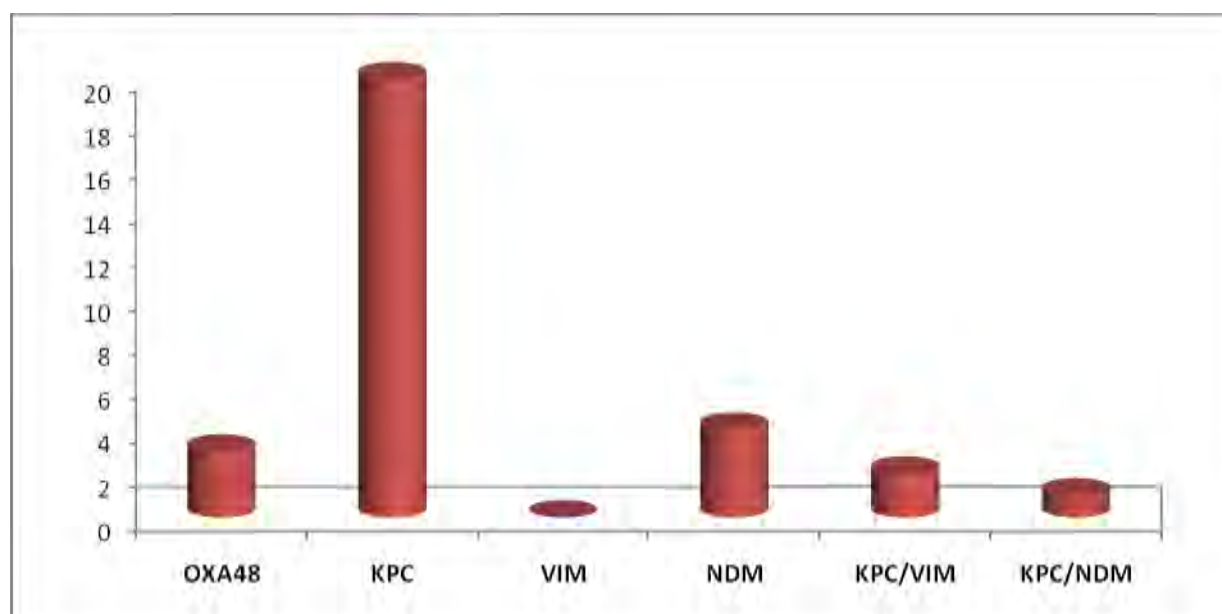
Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του αυτοματοποιημένου μηχανήματος Vitek-2 (BioMerieux) ως *Klebsiella pneumoniae*, ανθεκτικά σε meropenem και imipenem ( $MIC > 8\text{mg/L}$ ), όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Χρησιμοποιώντας εναιωρήματα αποικιών *Kl. pneumoniae*, που είχαν εξαχθεί από τα παραπάνω δείγματα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση βακτηριακού DNA, με τη διαδικασία που έχει περιγραφεί αναλυτικά προηγουμένως. Στη συνέχεια ακολούθησε διερεύνηση για την ύπαρξη του γονιδίου *bla<sub>OXA-48</sub>*, με ενίσχυση με PCR. Όσα στελέχη βρέθηκαν αρνητικά για το συγκεκριμένο γονίδιο διερευνήθηκαν περαιτέρω για την εύρεση του αιτιολογικού παράγοντα αντοχής, δηλαδή για τα γονίδια *bla<sub>KPC</sub>*, μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου *bla<sub>VIM</sub>* και *bla<sub>NDM-1</sub>*.

Από τα 30 στελέχη μόνο 3 ήταν θετικά για το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>*, ενώ στα υπόλοιπα στελέχη βρέθηκε κάποιο από τα προαναφερθέντα γονίδια παραγωγής καρβαπενεμάσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:



Α.ΦΥΛΑΞΗΣ	Α.ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΔΕΙΓΜΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ	ΟΧΑ48	KPC	VIM	NDM
A29	447	1/6/2017	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ	-	+	-	-
A31	375	1/6/2017	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ	-	+	-	-
A32	373	1/6/2017	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΜΕΘ	-	+	-	-
A39	700	4/6/2017	ΕΝΥ	ΜΕΘ	-	+	-	-
A51	1230	8/6/2017	ΕΝΥ	ΜΕΘ	-	+	+	-
A59	1249	9/6/2017	ΟΥΡΑ	ΠΠΑ	-	+	-	-
A55	1384	10/6/2017	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	-	+	-	-
A60	1349	10/6/2017	ΟΥΡΑ	ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗ	-	+	-	-
A57	1381	12/6/2017	ΠΥΟΝ	ΜΕΘ	-	+	+	-
A62	1577	13/6/2017	ΠΥΟΝ	ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	-	+	-	-
A76	1914	15/6/2017	ΟΥΡΑ	ΠΠΑ	-	-	-	+
A71	1995	16/6/2017	ΠΤΥΕΛΑ	ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ	-	+	-	-
A73	2010	16/6/2017	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	-	+	-	-
A67	2162	17/6/2017	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	-	+	-	-
A77	2224	18/6/2017	ΟΥΡΑ	Ε.Ι.	-	+	-	-
A96	2763	23/6/2017	ΟΥΡΑ	ΠΠΒ	-	+	-	-
A94	2893	25/6/2017	ΟΥΡΑ	ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ	-	-	-	+
A99	3033	26/6/2017	ΟΥΡΑ	ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	-	+	-	-
A103	2746	27/6/2017	ΙΣΤΟΣ	ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗ	-	+	-	-
A106	3155	27/6/2017	ΟΥΡΑ	ΠΠΒ	-	+	-	-
A105	3119	28/6/2017	ΤΡΑΥΜΑ	ΜΕΘ	-	+	-	-
A114	3420	29/6/2017	ΟΥΡΑ	Ε.Ι.	-	+	-	-
A115	3520	30/6/2017	ΠΤΥΕΛΑ	ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ	-	+	-	-
A116	3536	30/6/2017	ΟΥΡΑ	ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ	-	+	-	-
A162	5459	15/7/2017	ΑΙΜΑ	ΠΠΒ	+	-	-	-
A210	6980	30/7/2017	ΟΥΡΑ	ΠΠΑ	-	-	-	+
A224	7326	2/8/2017	ΟΥΡΑ	ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	-	-	-	+
A297	9216	20/8/2017	ΟΥΡΑ	ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ	+	-	-	-
A299	9272	21/8/2017	ΟΥΡΑ	ΠΠΒ	+	-	-	-
A334	936	12/9/2017	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	-	+	-	+



Εικόνα 18 Κατανομή των στελεχών σύμφωνα με τα γονίδια αντοχής.

Κατόπιν των μοριακών μεθόδων ανίχνευσης αντοχής στα 3 OXA-48 θετικά στελέχη έγινε στην συνέχεια ενίσχυση με PCR των επτά housekeeping γονιδίων (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE* *infB*



και *tonB*), ακολουθούμενη από sequencing και με τη βοήθεια της διαθέσιμης βάσης δεδομένων του Ινστιτούτου Παστέρ καθορίστηκε ο τύπος αλληλουχίας τους. Συνεπώς, σύμφωνα με την βάση δεδομένων και τα 3 στελέχη ανήκουν στον ST101.

Α.ΦΥΛΑΞΗΣ	Α.ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΔΕΙΓΜΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ	ΟΧΑ48	ST
A162	5459	15/7/2017	ΑΙΜΑ	ΠΠΒ	+	ST101
A297	9216	20/8/2017	ΟΥΡΑ	ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ	+	ST101
A299	9272	21/8/2017	ΟΥΡΑ	ΠΠΒ	+	ST101

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανθεκτικότητα στελεχών *Klebsiella pneumoniae* στις πενέμες στην Ελλάδα και πιο συγκεκριμένα στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Η *Klebsiella pneumoniae* είναι ένα Gram αρνητικό (-) βακτήριο το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Enterobacteriaceae. Βρίσκεται στον γαστρεντερικό σωλήνα των θηλαστικών ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας. Έχει ένα πολυσακχαριτικό έλυτρο που την προστατεύει από την φαγοκυττάρωση από τα κοκκιοκύτταρα πολυμορφοπύρρηνα του ξενιστή και της παρέχει προστασία και από την βακτηριοκτόνο δράση του ορού του ξενιστή. Άτομα με χαμηλή άμυνα στο αναπνευστικό σύστημα είναι ευαίσθητα σε λοίμωξη των πνευμόνων από *Klebsiella pneumoniae*, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή, νέκρωση και αιμορραγία του πνευμονικού ιστού. Η *Klebsiella pneumoniae* αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα ενδοноσοκομειακά μικρόβια που μπορεί να προκαλέσει πνευμονία, σηψαιμία και λοιμώξεις των μαλακών ιστών.

Από τα 30 καρβαπενέμη-ανθεκτικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που μελετήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, μόνο τα 3 ήταν ανθεκτικά στο γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>*, ενώ στα υπόλοιπα βρέθηκε κάποιο άλλο γονίδιο παραγωγής καρβαπενεμάσης. Στα 3 αυτά στελέχη έγινε ενίσχυση με PCR και sequencing και σύμφωνα με τη βάση δεδομένων (ινστιτούτο Παστέρ) καθορίστηκε ότι ανήκουν στον ST101. Το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στην Τουρκία το 2001. Για αρκετά χρόνια το συγκεκριμένο γονίδιο εντοπιζόταν μόνο στην Τουρκία και σχεδόν όλα τα στελέχη που παρήγαγαν την καρβαπενεμάση OXA-48 βρέθηκαν σε ασθενείς που νοσηλεύονταν στην Τουρκία ή σε κάποια περιοχή συνδεδεμένη με αυτή. Από το 2008 και έπειτα όμως το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* έχει βρεθεί σε αρκετές χώρες, κυρίως σε στελέχη *Kl. pneumoniae*. Η καρβαπενεμάση OXA-48 πλέον εντοπίζεται στην δυτική Ασία, στις βόρειες χώρες της Αφρικής καθώς και σε Ευρωπαϊκές χώρες και αυτές οι χώρες αποτελούν ρεζερβουάρ των στελεχών που παράγουν OXA-48. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ένας αυξανόμενος αριθμός στελεχών *Kl. pneumoniae* που παράγουν OXA-48, όχι μόνο στην Τουρκία αλλά και σε χώρες της Ευρώπης, όπως για παράδειγμα στην Γαλλία, την Ελλάδα και την Ισπανία και ανήκουν σε συγκεκριμένους κλώνους, συμπεριλαμβανομένου και του ST101.(28)

Όπως αναφέρθηκε, στην παρούσα μελέτη μόνο 3 στελέχη *Kl. pneumoniae* βρέθηκαν θετικά για παραγωγή καρβαπενεμάσης OXA-48. Το 2007 στο Βέλγιο απομονώθηκε για πρώτη φορά στέλεχος OXA-48 *Kl. pneumoniae* το οποίο έχει παρόμοιο γενετικό περιβάλλον με το στέλεχος που απομονώθηκε την πρώτη φορά από την Τουρκία, σε ασθενή ο οποίος δεν φάνηκε να είχε κάποια σχέση με αυτή την χώρα. Αξιοσημείωτο είναι ότι το συγκεκριμένο στέλεχος

χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητο στις καρβαπενέμες από 2 διαφορετικά αυτόματα συστήματα. (29) Το 2008 το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στον Λίβανο (30). Την ίδια χρονική περίοδο, σε μία μελέτη που διεξήχθη στην Σενεγάλη από τους O. Moquet et al., το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* βρέθηκε σε 11 στελέχη, εκ των οποίων όμως τα 9 έφεραν και το γονίδιο CTX-M-15. Περαιτέρω ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου της καρβαπενεμάσης OXA-48 έδειξε ότι το γονίδιο αποτελεί μέρος του σύνθετου τρανσποζονίου *Tn1999*, αποτελέσματα τα οποία συμφωνούν με τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αρχικά στην Τουρκία και πιο πρόσφατα στον Λίβανο και την Αίγυπτο (31). Το 2009 βρέθηκε στέλεχος *Kl. pneumoniae* θετικό για την παραγωγή καρβαπενεμάσης OXA-48 και στην Τυνησία, το γενετικό περιβάλλον του οποίου ήταν ίδιο με του στελέχους που απομονώθηκε την πρώτη φορά στην Τουρκία (32). Το συγκεκριμένο στέλεχος ωστόσο έφερε ταυτόχρονα τα γονίδια *bla<sub>CTX-M-15</sub>* και *bla<sub>TEM-1</sub>*. Την ίδια χρονιά, το 2009, έγινε ο πρώτος χαρακτηρισμός στελεχών *Kl. pneumoniae* θετικά για το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* και στο Μαρόκο, ενώ το 2011 κατά την διάρκεια ελέγχου δειγμάτων νερού της περιοχής του Μαρακές βρέθηκαν στελέχη *Serratia marcescens* που έφεραν το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* και παρατήρησαν ότι το γενετικό περιβάλλον αυτού είναι ίδιο με αυτό που είχε χαρακτηριστεί σε στέλεχος *Kl. pneumoniae*, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ανησυχία καθώς και η πιθανότητα μετάδοσης του συγκεκριμένου γονιδίου (33,34). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Βουκουρέστι της Ρουμανίας χαρακτηρίστηκαν λεπτομερώς *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες σε μοριακό επίπεδο και οι ενδείξεις ήταν ότι η περιοχή των Βαλκανίων αποτελεί σημαντική δεξαμενή καρβαπενεμασών NDM-1, OXA-48 και OXA-181(35). Η πρώτη αναφορά στελεχών *Kl. pneumoniae* που παράγουν OXA-48 στην Γαλλία έγινε το 2010, όπου η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι τα στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST395 και φιλοξενούν πλασμίδιο 70kb που φέρει το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>*, αλλά εκτός αυτού προάγει την παραγωγή και επιπλέον β-λακταμασών όπως OXA-1, SHV-11, CTX-M-15 και TEM-1.(36) Στην Ελλάδα, σε μια επιδημιολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2014-2016, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη *Kl. pneumoniae* εκφράζουν κατά κύριο λόγο το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>* (66,5%), ακολουθούμενο από τα γονίδια *bla<sub>NDM</sub>* (13,7%) και *bla<sub>VIM</sub>* (8,6%), τοποθετώντας στην τελευταία θέση τα στελέχη θετικά για το *bla<sub>OXA-48</sub>* (3,6%) δείχνοντας ότι η παρουσία αυτών των στελεχών εξακολουθεί να είναι σπάνια (37). Αναφορά στελεχών *Kl. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση OXA-48 έχει γίνει και στην Αλγερία το 2015 (38).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, και τα 3 στελέχη της παρούσας εργασίας ανήκουν στον κλώνο ST101. Ανθεκτικά στελέχη της *Klebsiella pneumoniae* του κλώνου ST101 έχουν αναφερθεί ως οι επικρατέστεροι κλώνοι σε ενδονοσοκομειακές παθήσεις σε διάφορες μεσογειακές χώρες όπως η Ιταλία(39), (40), η Λιβύη (41) και η Ισπανία (42). Ο κλώνος ST101

έχει περιγραφεί σε μονοκλωνική επιδημία σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας και στην Ελλάδα, για πρώτη φορά το 2013. Ωστόσο στην συγκεκριμένη μελέτη η ανθεκτικότητα των στελεχών δεν οφειλόταν στην παρουσία του γονιδίου *bla<sub>OXA-48</sub>* ούτε στην παρουσία κάποιου άλλου γονιδίου που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, αλλά στην παραγωγή του ενζύμου CTX-M-15 και στην μειωμένη έκφραση των γονιδίων *ompK35* και *ompK36*, γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις πορίνες της μεμβράνης (43). Σε μία μελέτη που διεξήχθη στο Παρίσι από το 2005 έως το 2007 ο G. Marcade et. al κατά την διάρκεια απομόνωσης στελεχών ESBLs βρήκε τον κλώνο ST101 σε 4 στελέχη, εκ των οποίων και τα 4 έφεραν το γονίδιο CTX-M-15. Ωστόσο, δεν έγινε χαρακτηρισμός για την παρουσία γονιδίων που παράγουν καρβαπενεμάσες (44). Ο κλώνος ST101 εκτός από την σχέση του με το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* έχει βρεθεί ότι σχετίζεται και με τις καρβαπενεμάσες KPC και NDM. (45,46)

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές αναφορές στελεχών *Kl. pneumoniae* θετικά για το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* που ανήκουν στον κλώνο ST101. Σε μια μελέτη που διεξήχθη στην Ισπανία την περίοδο 2010-2012 βρέθηκαν 28 καρβαπενέμη ανθεκτικά στελέχη *Kl. pneumoniae* τα οποία ανήκουν στον κλώνο ST101 και φέρουν το γονίδιο παραγωγής της καρβαπενεμάσης OXA-48. Ωστόσο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα στελέχη στην συγκεκριμένη μελέτη έφεραν ταυτόχρονα και το γονίδιο CTX-M-15 και ότι στους πάσχοντες ασθενείς είχε προηγηθεί χρήση καρβαπενεμών. (47). Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ισραήλ, οι Adler et al. βρήκαν 4 στελέχη που παράγουν OXA-48 σε διαφορετικούς ασθενείς, κανένας από τους οποίους δεν είναι από το Ισραήλ (2 από την Παλαιστίνη, ένας από την Ιορδανία και ένας από την Γεωργία) και οι 3 από τους 4 ασθενείς είχαν προηγούμενη νοσηλεία εκτός Ισραήλ (Ιορδανία και Γεωργία). Το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* εντοπίστηκε σε διαφορετικά κλωνικά στελέχη *E. coli*, σε ένα στέλεχος *Kl. oxytoca* και σε ένα στέλεχος *Kl. pneumoniae* ST101, το οποίο προηγουμένως είχε χαρακτηριστεί στην Τυνησία και την Ισπανία. Αξιοσημείωτο είναι ότι η απόκτηση του τελευταίου στελέχους πιστεύεται ότι πραγματοποιήθηκε μέσω της κοινότητας, λόγω των συχνών ταξιδιών της ασθενούς στην Ιορδανία καθώς δεν είχε προηγούμενη νοσηλεία και συνεπώς δεν μπορούσε να εντοπισθεί στον τομέα υγείας. Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί, ότι κατά την μελέτη του γενετικού περιβάλλοντος του εν λόγω γονιδίου στα διαφορετικά είδη στελεχών, παρατηρήθηκε ότι το *bla<sub>OXA-48</sub>* εντοπίζεται στο τρανποζόνιο *Tn1999.2* σε ένα πλασμίδιο 60kb με πανομοιότυπο RFLP μοτίβο, αυξάνοντας την ανησυχία στον επιστημονικό κλάδο για την τη μεταφορά παραγόντων αντοχής (48). Επιπλέον, σε μία μελέτη που διεξήχθη το 2011-2013 στην Ρουμανία σε καρβαπενέμη ανθεκτικά στελέχη Εντεροβακτηριακών βρέθηκαν στελέχη ST101 *Kl. pneumoniae* θετικά για την παραγωγή καρβαπενεμάσης OXA-48. (49) Στην Ιαπωνία μόνο δύο στελέχη *Klebsiella pneumoniae* ST101 OXA -48 θετικά είχαν βρεθεί μέχρι το 2013, τα οποία

απομονώθηκαν από ασθενείς οι οποίοι είχαν ταξιδέψει προηγουμένως στην Τουρκία και νοσηλεύτηκαν στην Αίγυπτο, όπου και στις 2 χώρες έχει γίνει αναφορά για την παρουσία τέτοιων στελεχών.(50)

Η εξάπλωση των στελεχών αυτών προτείνει ένα πιθανό σενάριο στο οποίο η «απόκτηση» νέων καθοριστικών παραγόντων αντίστασης μπορεί να δημιουργήσει στέλεχος εξαιρετικά ανθεκτικό σε πολλαπλά φάρμακα που λειτουργούν ενάντια στην *Klebsiella pneumoniae* και όχι μόνο σε αυτά που παράγουν καρβαπενεμάση ή ESBL.(51) Παρατηρείται ότι σε πολλές από τις παραπάνω μελέτες ότι τα στελέχη *Kl. pneumoniae* που παράγουν την καρβαπενεμάση OXA-48 εμφανίζουν μειωμένη ανθεκτικότητα στην ιμιπενέμη, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα τα στελέχη αυτά να μην εντοπίζονται κατά την διάρκεια ρουτίνας όπου γίνεται έλεγχος της αντιμικροβιακής ευαισθησίας. Το συγκεκριμένο πρόβλημα πιστεύεται ότι μπορεί να επιλυθεί με την χρήση ερταπενέμης, η οποία αποτελεί αντιμικροβιακό παράγοντα πιο ευαίσθητο στις καρβαπενεμάσες. Επιπλέον παρατηρείται ότι σε πολλές από τις προαναφερθέντες μελέτες στα στελέχη *Kl. pneumoniae* που ανήκουν στον κλώνο ST101, εκτός από την παρουσία κάποιου γονιδίου που παράγει καρβαπενεμάση, υπάρχει πολύ συχνά και κάποιος παράγοντας που χαρακτηρίζει τα στελέχη ως ESBLs, όπως για παράδειγμα ένζυμα τύπου CTX-M, SHV και TEM.

## ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Είναι πολλοί οι μικροοργανισμοί, είτε πρόκειται για Gram (+) είτε για Gram (-), οι οποίοι έχουν καταστεί ανθεκτικοί σε διάφορα αντιβιοτικά, και αυτό λόγω της συχνής χρήσης των αντιβιοτικών ή λόγω ανάπτυξης μηχανισμών αντοχής σε αυτά. Συγκεκριμένα για την *Klebsiella pneumoniae*, και την αντίστασή της στις καρβαπενέμες μελετώνται διάφορα γονίδια όπως το *bla<sub>OXA-48</sub>* που μελετήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία, για τον καθορισμό στελεχών που μπορεί να δημιουργηθούν και να είναι ανθεκτικά σε πολλά φάρμακα που λειτουργούν ενάντια στο συγκεκριμένο βακτήριο. Και εφόσον πρόκειται για ενδονοσοκομειακό μικρόβιο, το οποίο δημιουργεί σοβαρές λοιμώξεις στον άνθρωπο, η περαιτέρω έρευνα ανθεκτικών γονιδίων είναι σημαντικό να συνεχίζεται.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009 Apr 1;9(4):228–36.
2. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Oct 1;11(4):589–603.
3. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria - ScienceDirect [Internet]. [cited 2019 Jan 20]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309909700544>
4. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug 1;43(8):4178–82.
5. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug 1;43(8):4178–82.
6. McBride KE, Kenny JW, Stalker DM. Metabolism of the herbicide bromoxynil by *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*. *Appl Env Microbiol*. 1986 Aug 1;52(2):325–30.
7. Risk Factors for the Acquisition of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* among Hospitalized Patients | Microbial Drug Resistance [Internet]. [cited 2019 Jan 20]. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/mdr.2005.11.165>
8. Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, et al. Outbreaks in Distinct Regions Due to a Single *Klebsiella pneumoniae* Clone Carrying a blaVIM-1 Metallo-β-Lactamase Gene. *J Clin Microbiol*. 2005 Oct 1;43(10):5344–7.
9. Helander IM, Kato Y, Kilpeläinen I, Kostianen R, Lindner B, Nummila K, et al. Characterization of Lipopolysaccharides of Polymyxin-Resistant and Polymyxin-Sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur J Biochem*. 1996;237(1):272–8.
10. Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Functional Characterization of IS1999, an IS4 Family Element Involved in Mobilization and Expression of β-Lactam Resistance Genes. *J Bacteriol*. 2006 Sep 15;188(18):6506–14.
11. Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen G-X. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates Possessing the Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase KPC-2 in Intensive Care Units of a Chinese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jun 1;52(6):2014–8.
12. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Feb 1;16(2):112–22.
13. Alanis AJ. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch Med Res*. 2005 Nov 1;36(6):697–705.
14. Curtis, Sutter, Walker, Hoffman. Φαρμακολογία. Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Γαλανοπούλου-Κούβαρη Π., Λιάπη Χ., Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, ISBN:960-7398-89-0.



15. van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents*. 2000 May 1;14(4):327–35.
16. O'Daniel PI, Peng Z, Pi H, Testero SA, Ding D, Spink E, et al. Discovery of a New Class of Non- $\beta$ -lactam Inhibitors of Penicillin-Binding Proteins with Gram-Positive Antibacterial Activity. *J Am Chem Soc*. 2014 Mar 5;136(9):3664–72.
17. Reading C, Cole M. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977 May 1;11(5):852–7.
18. Bush K, Freudenberger JS, Sykes RB. Interaction of azthreonam and related monobactams with beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982 Sep 1;22(3):414–20.
19. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 Aug 1;28(2):302–7.
20. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo J-D, et al. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- $\beta$ -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Apr 1;44(4):891–7.
21. Oh E-J, Lee S, Park Y-J, Park JJ, Park K, Kim S-I, et al. Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase. *J Microbiol Methods*. 2003 Sep 1;54(3):411–8.
22. Koshland D, Botstein D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell*. 1980 Jul 1;20(3):749–60.
23. Yan J-J, Hsueh P-R, Ko W-C, Luh K-T, Tsai S-H, Wu H-M, et al. Metallo- $\beta$ -Lactamases in Clinical *Pseudomonas* Isolates in Taiwan and Identification of VIM-3, a Novel Variant of the VIM-2 Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Aug 1;45(8):2224–8.
24. Poirel L, Ros A, Carricajo A, Berthelot P, Pozzetto B, Bernabeu S, et al. Extremely Drug-Resistant *Citrobacter freundii* Isolate Producing NDM-1 and Other Carbapenemases Identified in a Patient Returning from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jan 1;55(1):447–8.
25. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou M-FI, Babini GS, Douboyas J, et al. Outbreak of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1 Carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar 1;38(3):1290–2.
26. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, O'Connor FS, Giesecke J, Participants TEN-1 S. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. *Eurosurveillance* [Internet]. 2010 Nov 18 [cited 2019 Jan 20]; Available from: <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/205>
27. Vasileiadou K, Papakostas S, Triantafyllidis A, Kappas I, Abatzopoulos TJ. A Multiplex PCR Method for Rapid Identification of *Brachionus* Rotifers. *Mar Biotechnol*. 2009 Feb 1;11(1):53–61.

28. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2013 Aug 1;18(31).
29. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang T-D, Nordmann P. Plasmid-Encoded Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase OXA-48 in an Imipenem-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* Strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3463–4.
30. Matar GM, Cuzon G, Araj GF, Naas T, Corkill J, Kattar MM, et al. Oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Sep;14(9):887–8.
31. Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, Seck A, Arouna O, Bercion R, et al. Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant Enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):143–4.
32. Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Jul;36(1):91–3.
33. Potron A, Poirel L, Bussy F, Nordmann P. Occurrence of the Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase Gene blaOXA-48 in the Environment in Morocco<sup>▽</sup>. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Nov;55(11):5413–4.
34. Benouda A, Touzani O, Khairallah M-T, Araj GF, Matar GM. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010 Jun;104(4):327–30.
35. Deshpande LM, Flonta M, Jones RN, Castanheira M. Detection of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Romania: report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Med Microbiol*. 2014 Mar 1;63(Pt\_3):483–4.
36. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May 1;55(5):2420–3.
37. Galani I, Karaikos I, Karantani I, Papoutsaki V, Maraki S, Papaioannou V, et al. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2018 Aug;23(31).
38. Cuzon G, Bentchouala C, Vogel A, Héry M, Lezzar A, Smati F, et al. First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Dec;46(6):725–7.
39. Mammina C, Bonura C, Aleo A, Fasciana T, Brunelli T, Pesavento G, et al. Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. 2012 Jun;39(6):543–5.
40. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Adembri C, Dell'utri P, Santagati M, et al. Emergence of an extensively drug-resistant ArmA- and KPC-2-producing ST101 *Klebsiella pneumoniae* clone in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Aug 1;68(8):1932–4.

41. Kraiem AG, Zorgani A, Elahmer O, Hammami A, Chaaben BM, Ghenghesh KS. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase and OXA-48 carbapenemases in Gram-negative bacilli isolates in Libya. *Libyan J Med*. 2015 Jan 1;10(1):29206.
42. Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic Carbapenem Resistance Associated with OXA-40 Carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* Isolates from a Hospital in Northern Spain. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec 1;40(12):4741–3.
43. Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Koumaki V, Xidopoulos G, Chatzipantazi V, et al. Outbreak Caused by an Ertapenem-Resistant, CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 101 Clone Carrying an OmpK36 Porin Variant. *J Clin Microbiol*. 2013 Oct 1;51(10):3176–82.
44. Marcade G, Brisse S, Bialek S, Marcon E, Leflon-Guibout V, Passet V, et al. The emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of international clones ST13, ST16, ST35, ST48 and ST101 in a teaching hospital in the Paris region. *Epidemiol Infect*. 2013 Aug;141(8):1705–12.
45. Del Franco M, Paone L, Novati R, Giacomazzi CG, Bagattini M, Galotto C, et al. Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST1789). *BMC Microbiol*. 2015 Nov 9;15(1):260.
46. El-Herte RI, Araj GF, Matar GM, Baroud M, Kanafani ZA, Kanj SS. Detection of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in Lebanon. *J Infect Dev Ctries*. 2012 May 14;6(5):457–61.
47. Cubero M, Cuervo G, Dominguez MÁ, Tubau F, Martí S, Sevillano E, et al. Carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isogenic isolates of *Klebsiella pneumoniae* ST101 causing infection in a tertiary hospital. *BMC Microbiol*. 2015 Sep 3;15(1):177.
48. Adler A, Shklyar M, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Dhaher Y, Edgar R, et al. Introduction of OXA-48-producing Enterobacteriaceae to Israeli hospitals by medical tourism. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Dec 1;66(12):2763–6.
49. Dortet L, Flonta M, Boudehen Y-M, Creton E, Bernabeu S, Vogel A, et al. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in Romania. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Nov;59(11):7100–3.
50. Hashimoto A, Nagamatsu M, Ohmagari N, Hayakawa K, Kato Y, Kirikae T. Isolation of OXA-48 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST101 from an Overseas Traveler Returning to Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2014;67(2):120–1.
51. Cubero M, Cuervo G, Dominguez MÁ, Tubau F, Martí S, Sevillano E, et al. Carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isogenic isolates of *Klebsiella pneumoniae* ST101 causing infection in a tertiary hospital. *BMC Microbiol* [Internet]. 2015 Dec [cited 2019 Jan 13];15(1). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/177>